

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Fylogeografie perleťovce mokřadního (*Boloria
eunomia*) a srovnání s podobně rozšířenými druhy**

Diplomová práce

Bc. Jana Marešová

Školitel: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D.
Konzultant: M.Sc. Pavel Fortunato Matos Maravi

České Budějovice 2015

MAREŠOVÁ J. 2015. Fylogeografie perleťovce mokřadního (*Boloria eunomia*) a srovnání s podobně rozšířenými druhy. [Phylogeography of *Boloria eunomia* and comparison with similarly distributed species. Mgr. Thesis, in Czech.] – 65 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Phylogeography, phylogeny and population structure were studied in two similarly distributed butterflies, the Bog Fritillary (*Boloria eunomia*) and the Small Pearl-bordered Fritillary (*Boloria selene*). Sequences of mitochondrial gen for COI and nuclear Wingless and Arginine Kinase were used for analyses, for reconstruction of evolutionary relationships within both species and for comparison of phylogeography patterns.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 24. 4. 2015

Poděkování:

Především bych ráda poděkovala Zdeňkovi Faltýnkovi Fricovi za trpělivost, podporu, velkou pomoc při práci na analýzách, za mnoho cenných rad a spoustu času, který mi při psaní věnoval. Za konzultace bych velmi ráda poděkovala Janu Zimovi. Janu Ch. Habelovi bych také ráda poděkovala za poskytnutou vyizolovanou DNA. Marcinovi Sielezniewovi za poskytnuté sekvence DNA. Za pomoc s izolací některých vzorků bych ráda poděkovala Aleně Bartoňové. Vzorky motýlů poskytli Jiří Beneš, Oldřich Čížek, Jiří Darebník, Dmitrij Goško, Jan Ch. Habel, Vladimír Hula, Martin Konvička, Dan Leština, Gabriel Nève, Paul Opler, Alois Pavlíčko, Anežka Pavlíková, Nikolaj Rubin, Jurij Ševnin, Jiří Skala, Lukáš Spitzer a Pavla Tájková. Dále děkujeme Robertu Ouředníkovi z Krajského úřadu Jihočeského kraje v Českých Budějovicích za pomoc při udělení výjimky na sběr jedinců perleťovce mokřadního, který patří v České republice mezi zvláště chráněné druhy živočichů. Velmi děkuji svým rodičům, kteří mě vždy během studia podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Biogeografie Holarktického regionu	2
1.1.1	Biogeografie chladnomilných druhů	4
1.2	Klasifikace	5
1.2.1	Perleťovec mokřadní (<i>B. eunomia</i>)	5
1.2.2	Perleťovec dvanáctitečný (<i>B. selene</i>)	7
1.3	Rozšíření a biotop	8
1.3.1	Perleťovec mokřadní (<i>B. eunomia</i>)	8
1.3.2	Perleťovec dvanáctitečný (<i>B. selene</i>)	9
1.4	Ekologie a chování.....	10
1.4.1	Perleťovec mokřadní (<i>B. eunomia</i>)	10
1.4.2	Perleťovec dvanáctitečný (<i>B. selene</i>)	12
1.5	Fylogenetické vztahy a fylogeografie	12
2	CÍLE PRÁCE	14
3	METODIKA.....	15
3.1	Materiál.....	15
3.2	Izolace dna	15
3.3	PCR.....	16
3.4	Elektroforéza.....	17
3.5	Sekvenace a tvorba alignmentu	17
3.6	Analýzy.....	17
3.6.1	BEAST – datování vzniku.....	17
3.6.2	Haplotypové sítě.....	18
3.6.3	DNASP	18
3.6.4	Arlequin	19
3.6.5	Mantelův test	19
4	VÝSLEDKY	20
4.1	Haplotypové sítě (<i>B. eunomia</i>).....	20
4.2	Fylogenetický strom a molekulární datování (<i>B. eunomia</i>).....	21
4.3	Populačně genetické analýzy (<i>B. eunomia</i>)	26
4.4	Haplotypové sítě (<i>B. selene</i>)	27
4.5	Fylogenetický strom a molekulární datování (<i>B. selene</i>).....	28

4.6	Populačně genetické analýzy (<i>B. selene</i>)	32
5	DISKUZE.....	33
5.1	Fylogeografická historie perleťovce mokřadního (<i>Boloria eunomia</i>)	33
5.2	Porovnání mitochondriálních a nukleárních markerů.....	36
5.3	Fylogeografická historie perleťovce dvanáctitečného (<i>Boloria selene</i>) a srovnání s <i>B. eunomia</i>	37
6	ZÁVĚR.....	38
7	LITERATURA.....	39
8	PŘÍLOHY.....	50

1 ÚVOD

Mění se klimatické podmínky měly a mají výrazný vliv na mnoho organismů (Hewitt 1996; Schmitt 2007). Distribuce druhů se s vlivem klimatických změn měnila jak v minulosti v důsledku glaciálních cyklů, tak v současnosti, kdy dochází ke zvyšování teplot (Hill *et al.* 2002; Parmesan *et al.* 1999; Thomas *et al.* 2004). Klimatické změny vedou organismy buď k adaptacím na nové ekologické podmínky, nebo k ústupu do refugií, což vede k disjunktnímu rozšíření některých taxonů. V tomto kontextu, druhy náležící do různých ekologických a biogeografických skupin reagují odlišně na abiotické změny (Habel *et al.* 2010; Schmitt 2007). V období čtvrtohor se díky klimatickým výkyvům vyvinuly dvě velké skupiny odlišně adaptovaných živočichů: (1) temperátní druhy - široce rozšířené v interglaciálech a naopak za nepříznivých podmínek glaciálů tlačené k ústupu do jižních refugií (Hewitt 1999; Seddon *et al.* 2001; Schmitt & Seitz 2002); (2) chladnomilné druhy – s opačným paternem (Dalen *et al.* 2007; Mardulyn *et al.* 2009; Ronikier *et al.* 2012).

U chladnomilných organismů se tedy předpokládá, že byly v průběhu posledního glaciálu široce rozšířeny a naopak na oteplování způsobené nástupem interglaciálu reagovaly posunem populací na sever nebo v případě jižních populací ústupem do vyšších nadmořských výšek (Holdhaus 1954; de Lattin 1967; Varga & Schmitt 2008). Boreo-montánní druhy reprezentují kombinaci vlastností kontinentálních, arktických a alpinských druhů (Habel *et al.* 2010). Typické pro ně je, že mají disjunktní distribuci. Alpské a severské populace jsou nyní odděleny a tudíž byl genový tok mezi těmito populacemi v posledních 10 000 letech zastaven. Také genový tok mezi Eurasií a Severní Amerikou, který byl umožněn především díky pevninskému mostu v Beringově úžině, byl přerušen a to nejpozději při nástupu posledního interglaciálu (Mutanen *et al.* 2012).

Ve srovnání s cévnatými rostlinami a obratlovci je studií týkajících se hmyzu s holarktickým rozšířením podstatně méně. Motýli jsou díky svému atraktivnímu vzhledu zkoumání již po staletí a naše znalosti jejich morfologie, ekologických nároků, taxonomie a rozšíření jsou zřejmě lepší, než by se dalo říct o jakékoliv jiné skupině hmyzu (Vila *et al.* 2011). Fylogeografie druhů s mediteránním, kontinentálním či arkticko-alpickým rozšířením je relativně dobře prozkoumána, avšak o druzích s boreo-montánním rozšířením se toho zatím moc neví (Habel *et al.* 2010; Varga & Schmitt 2008). Otázkami distribuce druhů v Holarktickém regionu se zabývali vědci již v minulém století (de Lattin 1967; Nabokov 1945), avšak fylogeografické studie motýlů s takovýmto rozšířením jsou stále neúplné, zaměřené pouze na malé geografické oblasti či s velice malým množstvím

použitých vzorků. Jsou většinou pouze vedlejším produktem studií fylogeneze vyšších taxonomických skupin (Kodandaramaiah *et al.* 2010; Simonsen *et al.* 2010). Proto jsem se ve své diplomové práci rozhodla zabývat srovnáním fylogeografie dvou druhů motýlů s holarktickým rozšířením, obývajících různé habitaty – perleťovec mokřadní (*Boloria eunomia*) a perleťovec dvanáctitečný (*Boloria selene*).

1.1 Biogeografie Holarktického regionu

Současná eurasijská a severoamerická fauna je výsledkem dlouhodobého působení kontinentálních pohybů, klimatických cyklů a biotických interakcí. Utváření Palearktického regionu do podoby jak ho známe dnes, začalo v období eocénu zhruba před 53-49 miliony let kolizí Eurasie s africkou a indickou tektonickou deskou. Výsledkem nárazu Indie do Asie bylo postupné zvedání Himalájí. Pohoří následně začalo bránit přísunu vlhkosti ze západní Asie do vnitrozemí, což bylo jednou z příčin zvyšující se kontinentality na většině území Eurasie (Ramstein *et al.* 1997; Ruddiman & Kurzbach 1989). Současně došlo ke zmenšování původního moře Thetys, které dalo vzniknout dnešnímu Středozemnímu moři (Dercourt *et al.* 1986; Dewey *et al.* 1973). Od eocénu tedy dochází na Zemi k ochlazování. K zalednění Antarktidy došlo zhruba před 35 miliony let a arktický ledovec poprvé vznikl před 3 miliony let. Ochlazování vyvrcholilo v období pleistocénu (2,5Mya – 12ky) charakteristickém dobami ledovými, které vedly k opakovanému poklesu teplot a postupu ledovců (Hewitt 2000; Malicky 2000; Zachos *et al.* 2001). Ke klimatickým oscilacím dochází každých 100, 41 a 21 tisíc let a jsou způsobeny periodicky se opakujícími výkyvy v oběžné dráze Země kolem Slunce. Obrovské plochy ledovců obklopené permafrostem, nižší globální teplota a zhoršená dostupnost vody měly vliv na rozšíření druhů (Bennett 1997; Hewitt 2004; Williams *et al.* 1998). To, jak doby ledové působí na jednotlivé druhy, se liší se zeměpisnou šířkou a topografií území, která obývají.

Období glaciálů, mimo jiné i poslední glaciální maximum (LGM), byla klíčovými událostmi v historii rozšíření většiny druhů a reprezentují opačný klimatický extrém k dnešnímu interglaciálnímu klimatu (Hewitt 2004). Pouze před 21-18 tisíci let byly krajina a klima na severní polokouli dramaticky odlišné ve srovnání s dneškem. Arktické ledovce pokrývaly velké území Evropy a Severní Ameriky. Velká evropská pohoří jako Alpy, Pyreneje a Karpaty byla také zaledněna. Současně velké oblasti severovýchodní Asie a severozápadní Ameriky byly pokryty permafrostem, nikoliv ledem.

Díky tomu, že klimatické podmínky byly podstatně sušší a chladnější, došlo ke snížení hladiny světových moří zhruba o 120 m, což mělo na severní polokouli za následek vytvoření pevninského mostu v oblasti Beringovy úžiny (Hewitt 2004).

Ke vzniku pevninského mostu v Beringově úžině došlo v průběhu čtvrtohor několikrát, což umožnilo druhům umožněna migraci či disperzi mezi Eurasií a Severní Amerikou (Hopkins *et al.* 1982; Sanmartín *et al.* 2001). Velká část Beringie nebyla v glaciálech zaledněna (Dyke 2004) a oblast nesloužila pouze jako migrační koridor (Zigouris *et al.* 2013). Fosilní záznamy a větší genetická diverzita některých zde žijících druhů naznačují, že se v této oblasti nacházela refugia a došlo odtud k expanzi druhů s cirkumpolárním rozšířením (Hewitt 2004; Eidesen *et al.* 2013). Distribuce druhů v průběhu LGM, ale také předchozích glaciálů, byla tedy velmi odlišná od té dnešní. Změny v rozšíření se projevily nejen v zeměpisné šířce a nadmořské výšce, ale také longitudinálně, díky otevření nových migračních cest (Hewitt 2004).

Následkem klesající teploty a šíření ledovců velká část druhů zažila výrazné zmenšení a fragmentaci areálu rozšíření, díky čemuž vznikaly více či méně izolované refugiální populace (Hewitt 1996, 2004). V průběhu tohoto chladného období byly druhy donuceny k ústupu na jih směrem k rovníku. Boreální druhy v Severní Americe a Evropě přežily na jih od ledovce a na severovýchodě Palearktického regionu, kde ledovec nebyl. Jak ukazují fosilní záznamy z Evropy a Severní Ameriky, většina temperátních druhů se stáhla do refugií v jižních zeměpisných šířkách. V Evropě to byly Iberský, Apeninský a Balkánský poloostrov, v Severní Americe byla pro přežití druhů významná oblast okolo čtyřicáté rovnoběžky (Hewitt 2004; Schmitt *et al.* 2010; Taberlet *et al.* 1998). Pro populace v refugiích je typická větší genetická diverzita v porovnání s nedávno vzniklými populacemi (Hewitt 2000). Na základě demografických změn, distribuce genů a genotypů v krajině je, za využití vnitrodruhových molekulárně fylogeografických analýz, možné udělat si obrázek, kde se takováto refugia nacházela (Avise 2000).

Po ústupu ledovců v období zhruba před 10 000 let se severně položené oblasti opět staly obyvatelnými a druhy rekolonizovaly tyto oblasti z jednoho nebo více refugií (Avise 2000; Hewitt 2000). Tyto rekolonizační události byly často ovlivňovány migračními bariérami, v případě Evropy to byly Alpy nebo Pyreneje, které překážely některým taxonům v disperzi z mediteránních refugií zpět na sever (Taberlet *et al.* 1998). Nejčastěji zde tedy docházelo k rekolonizaci z Balkánského poloostrova (Hewitt 2004).

Poslední oblastí, kde v Evropě ustoupil ledovec, byla Fenoskandie (Lundqvist & Mejdahl 1995). K rekolonizaci tohoto území došlo později než v jižnějších oblastech. Krátká

doba od rekolonizace severu má za následek geneticky více homogenní populace oproti populacím v ostatních temperátních oblastech (Pamilo & Savolainen 1999). Toto bylo pozorováno u mnoha druhů v Severní Americe a Evropě (Hewitt 1996; Kutschera *et al.* 2013; Marr *et al.* 2013; Michaux *et al.* 2003; Ronikier *et al.* 2012; Schmitt *et al.* 2002; Winkler *et al.* 2013). Nicméně i v severně položených oblastech se může vyskytovat vysoký stupeň genetické diferenciace mezi populacemi a to díky dočasnému snížení velikosti populace a následné větší síle působení genetického driftu (Gyllensten 1985; Mikko & Andersson 1995).

1.1.1 Biogeografie chladnomilných druhů

Boreo-montánní a arkticko-alpínská oblast je rozsáhlá a zahrnuje většinu severní polokoule (de Lattin 1967). Současná distribuce druhů adaptovaných na vysoké nadmořské výšky a šířky je často disjunktní, s kontinuální distribucí na severu a ostrůvkovitým výskytem ve vysokých nadmořských výškách jižních pohoří (de Lattin 1967). Schmitt (2007) uvažuje dva obecné biografické patery u chladomilných druhů: (1) druhy měly nesouvislou distribuci i v období glaciálů, což by mělo za následek podstatně hlubší/starší genetické divergence; (2) druhy byly v průběhu glaciálu kontinuálně široce rozšířené, k přerušení genového toku došlo až v průběhu recentního oteplování a divergence mezi populacemi je nedávná.

Ve vysokých nadmořských výškách a ve vyšších zeměpisných šířkách byl v minulosti většinou ledovec a tudíž je zřejmé, že zde muselo dojít k rekolonizaci (Muster & Berendonk 2006). Na populace členovců v jižním disjunktním areálu lze nahlížet jako na relikty, které vznikaly ve velmi odlišném období (Schmitt *et al.* 2010). Ostrůvkovité populace jsou malé a silně izolované od jejich distribučního centra (Varga & Schmitt 2008).

Druhy adaptované na chlad, jako druhy arkticko-alpínských a boreo-montánních oblastí, byly více úspěšné v období glaciálů a byly zasaženy bottleneckem a zmenšováním areálu v průběhu interglaciálů (de Lattin 1967; Hewitt 2004). Hypotézy o refugiích a modely pro porozumění procesů postglaciální kolonizace jsou většinou odvozeny ze studií temperátních druhů (Schmitt *et al.* 2010). Mnohé latitudinálně se posouvající druhy zažily rozsáhlé postglaciální expanze a velký populační růst, který se datuje na konec posledního glaciálního maxima zhruba před 10 000 let (Galbreath *et al.* 2009). Nicméně chladomilné druhy nemusely vždy na změnu klimatu reagovat pouze latitudinálními posuny (Galbreath *et al.* 2009). U mnohých druhů naproti tomu převažovaly v glaciální historii posuny altitudinálního charakteru, tedy druhy měnily své rozšíření v souvislosti s nadmořskou

výškou. A proto by měly vykazovat populační expanze související se vzestupem LGM, které byly následovány populačním poklesem v průběhu Holocénu, kdy oteplování klimatu způsobilo posun do hor (Galbreath *et al.* 2009).

Nutno však podotknout, že období glaciálů byla řádově delší než období interglaciálů, takže temperátní druhy strávily mnohem delší dobu v refugích než chladomilné druhy (Stewart 2010).

1.2 Klasifikace

Holarktičtí perleťovci rodu *Boloria* Moore z čeledi babočkovití (Nymphalidae) byli podnětem mnoha systematických studií po větší část minulého století. Nejvíce diskutovány jsou taxonomické otázky jako celkový počet druhů versus poddruhů (Higgins 1975; Warren 1944) či zda se jedná u těchto motýlů o jeden, dva nebo tři samostatné rody (Nève 1996; Warren *et al.* 1946). Oproti předchozím autorům Simonsen (2005) považuje taxony *Proclassiana* Reuss a *Clossiana* Reuss za podrody *Boloria* s.l. K tomuto výsledku dospěl na základě fylogeneze založené na morfologických znacích samčích a samičích genitálií. Další, kdo se zabýval touto problematikou, byli Tuzov & Bozano (2006), kteří taxony *Proclassiana* (1 druh), *Boloria* (17 druhů) a *Clossiana* (28 druhů) označují jako samostatné rody. Pelham (2008) se vrací k tvrzení předchozích autorů a všechny druhy řadí do samostatného rodu *Boloria* s.l., v rozporu se Simonsenem (2005) však taxon *Proclassiana* nepovažuje za samostatný podrod, ale řadí ho do podrodu *Boloria* s.str. Simonsen (2005) připustil, že pouze morfologické znaky genitálií nestačí k vyřešení vnitřních vztahů v rámci podrodů a tak v práci Simonsen *et al.* (2010) rozšířil fylogenezi o molekulární znaky. Výsledná a zatím poslední klasifikace se shoduje s klasifikací Simonsena (2005):

subtribus *Boloria* Warren, dos Passos and Grey, 1946

rod *Boloria* Moore, 1900

podrod *Boloria* Moore, 1900

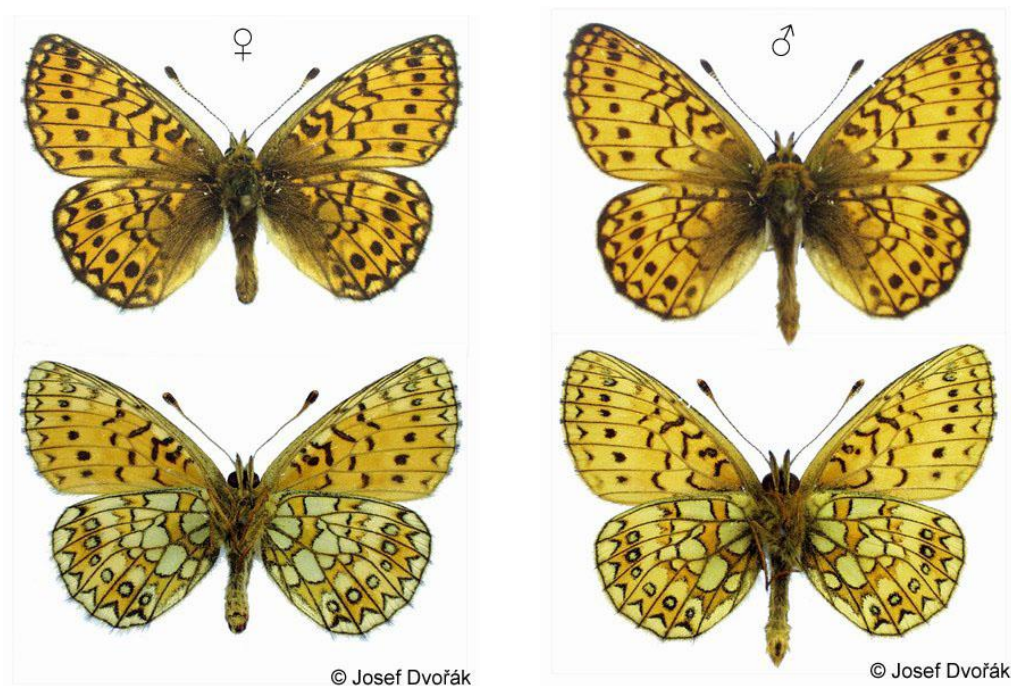
podrod *Proclassiana* Reuss, 1921

podrod *Clossiana* Reuss, 1920

1.2.1 Perleťovec mokřadní (*B. eunomia*)

Zkoumaný perleťovec mokřadní (*Boloria (Proclassiana) eunomia*) (Obrázek 1) je jediným zástupcem podrodu *Proclassiana* Reuss, 1921. Tento druh byl poprvé popsán Esperem roku

1799 jako *Papilio eunomia*. Hübner tomuto popisu nevěnoval pozornost a roku 1800 druh popsal pod novým názvem *Argynnis apherape*, pod tímto jménem byl druh známý až do té doby, kdy Reuss znovu objevil původní Esperův popis a druhové jméno *apherape* označil jako mladší synonymum *eunomia* a proto je tedy považováno za název neplatný (Mayr & Ashlock 1991).



Obrázek 1 Perleťovec mokřadní, *Boloria eunomia* (foto Josef Dvořák)

Bylo popsáno mnoho poddruhů:

Střední Evropa:

- *eunomia* (Esper, 1799) - Německo
- *diluta* (Heydemann, 1942) - Německo
- *helmina* (Fruhstorfer, 1922) - Prusko
- *gieysztori* (Krzywicki, 1967) - Bialowezský les, Polsko

Jižní Evropa:

- *ceretanensis* (Deslandes, 1930) - Pyreneje
- *campurrianensis* (Gómez-Bustillo *et al.* 1985) - Kantaberské hory

Fenoskandinávie :

- *montana* (Petersen, 1947) - Švédsko (Laponsko)
- *subargentata* (Petersen, 1947) - centrální Švédsko
- *ossianus* (Herbst, 1800) - Laponsko, severní Rusko a Sibiř

Asie:

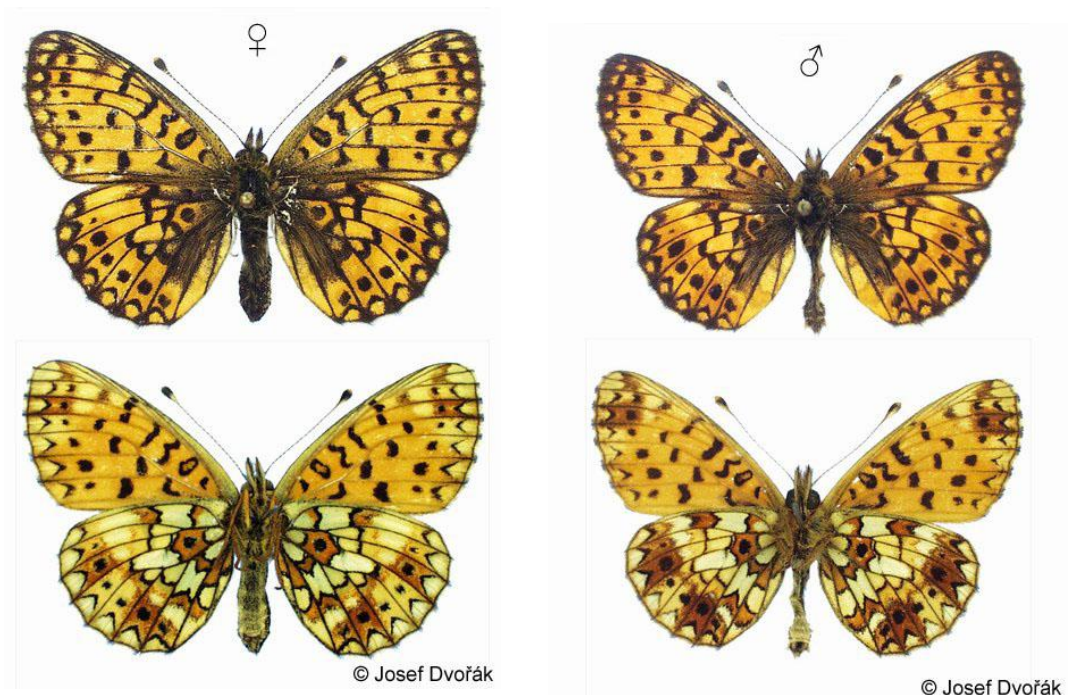
- *asiatica* (Staudinger, 1901) - Amurský region, východní Sibiř
- *riamina* (Korshunov, 1997) - Novosibirsk

Severní Amerika:

- *dawsoni* (Barnes & McDunnough, 1916) - Manitoba, Ontario, Michigan a Main
- *tricularis* (Hübner, 1821) - Labrador, Aljaška, Atlin, Britská Kolumbie
- *denali* (Klots, 1940) - Mount McKinley na Aljašce
- *nichollae* (Barnes & Benjamin, 1926) - Rocky Mountains v provinciích Alberta a Britská Kolumbie, Kanada
- *laddi* (Klots, 1940) - jižní Wyoming
- *caelestis* (Hemming), 1933 - Colorado
- *ursadentis* Ferris & Groothuis, 1971 - Beartooth Pass, Park country, Wyoming

1.2.2 Perleťovec dvanáctitečný (*B. selene*)

Perleťovec dvanáctitečný (*B. selene*) (Obrázek 2) je jedním z 28 druhů patřících dle nejnovější klasifikace do podrodu *Clossiana* Reus, 1921 (Simonsen *et al.* 2010).



Obrázek 2 Perleťovec dvanáctitečný, *Boloria selene* (foto Josef Dvořák)

Bylo popsáno několik poddruhů:

Euroasie:

- *selene* Schiffermüller, 1775 - EU, západní Sibiř, Kazachstán, Altai, Sayan, Transbaikalia
- *thalia* (Hübner, 1799) – arktická Evropa, severní Sibiř
- *dilutior* Fixsen, 1887 – východní Amur, Ussuri
- *chibiana* (Matsumura, 1927) – Sakhalin, Kunashir

Severní Amerika:

- *myrina* Cramer, 1777 – New Hampshire, New York, Maryland
- *nebraskensis* Holland, 1928 – Nebraska, Ohio
- *sabulocollis* Kohler, 1977 – Nebraska, Dakota, Colorado
- *tollandensis* Barnes & Benjamin, 1925 – Rocky Mountains, British Columbia
- *albequina* Holland, 1928 – Yukon, Aljaška
- *atrocotalis* Huard, 1927 – Nova Scotia, Saskatchewan, Quebec, Manitoba, Maine, Vermont, New Hampshire, New York, Michigan, Wisconsin, Minnesota, Severní Dakota
- *terraenovae* Holland, 1928 – Newfoundland

1.3 Rozšíření a biotop

1.3.1 Perleťovec mokřadní (*B. eunomia*)

Perleťovec mokřadní (*Boloria eunomia*) je holarktickým, boreo-montánním druhem s disjunktní distribucí typickou pro glaciální relikty (Warnecke 1942). Tento druh je rozšířen od Evropy, přes severní Asii až do Severní Ameriky (Nève *et al.* 2008; Nève *et al.* 2009; Tuzov & Bozano 2006) (Obrázek 3). V Evropě se souvisle vyskytuje pouze ve Skandinávii a Pobaltí, v dalších zemích je rozšířen ostrůvkovitě (Beneš *et al.* 2002; Kudrna *et al.* 2011). Tohoto motýla můžeme tedy nalézt v České republice na Šumavě, dále ve Španělsku, Francii, Belgii, Německu, Alpských zemích, východním Polsku, izolovaně se vyskytuje na Staré Planině v Bulharsku (Abadjiev 1995; Beneš *et al.* 2002; Kudrna *et al.* 2011), ale také v Srbsku (Jakšić *et al.* 2007). Na východ dále v Bělorusku, na Ukrajině, severnějších oblastech Ruska, Mongolsku (Gorbunov 2001; Tuzov & Bozano 2006), severní Číně (Lang 2012) a také v Severní Americe (Layberry *et al.* 1998).



Obrázek 3 Mapa rozšíření druhu *B. eunomia*

Typickými biotopy *B. eunomia* jsou především horská přechodová rašeliniště a jejich lemy a také zamokřené horské či podhorské louky (nejčastěji horské trojštětové louky Polygono-Trisetion) (Beneš *et al.* 2002).

Habitat *B. eunomia* v Ardenách je vlhký, bažinatý s přítomností rdesna hadího kořene (*Polygonum bistorta*). Pro přežití druhu je zapotřebí, aby byly přítomny stromy a aby stanoviště bylo v blízkosti lesního okraje. Trsy bezkolence modrého (*Molinia coerulea*) či jiných trav housenky využívají k odpočinku (Nève 1996).

V okolí Bělověže v Polsku obývá perleťovec mokřadní dvě různá stanoviště a to rašeliniště a vlhké louky, což se projevuje odlišným fenotypem (Krzywicki 1967). V Bádensku-Württembersku tento druh žije ve stejném typu stanovišť (Ebert & Rennwald 1991).

V České republice se vyskytuje pouze v jižních Čechách a to na Šumavě a v šumavském podhůří (540 – 1040 m n. m.). Pro tuto oblast byl poprvé popsán roku 1963, kdy byl objeven v přírodní rezervaci Mrtvý Luh, což je asi 1250 ha velký systém rašelinišť a podmáčených luk podél horního toku Vltavy (Nève *et al.* 2008). Za posledních několik desetiletí motýl znásobil rozsah původně obsazeného území a obývá oblast o rozloze zhruba 450 km². Nejvzdálenější kolonie se nachází cca 25 km od zdrojové populace (Beneš *et al.* 2002; Pavlíčko 1996a, b). České populace plynule navazují na výskyt v Bavorsku (Beneš *et al.* 2002).

Ve Fénoskandinávii druh obývá rašelinné oblasti tajgy (Nève 1996).

V severní Americe druh obývá bažinaté biotopy, vlhkou tundru a vlhké alpské louky (Layberry *et al.* 1998).

1.3.2 Perleťovec dvanáctitečný (*B. selene*)

Perleťovec dvanáctitečný je také druh s holarktickým rozšířením. Vyskytuje se od severní poloviny Španělska a Portugalska přes Francii, Velkou Británii, střední a severní Evropu (Kudrna *et al.* 2011), Sibiř, Dálný východ, Koreu, Sachalin a Japonsko (Gorbunov 2001; Tuzov & Bozano 2006) až do Severní Ameriky (Layberry *et al.* 1998) (Obrázek 4). Chybí na většině území Itálie a Balkánského poloostrova (Kudrna *et al.* 2011).



Obrázek 4 Mapa rozšíření *B. selene*

V České republice je druh dosud široce rozšířený, úbytek lze spíše zaznamenat v početnosti populací. Vzácný je však v intenzivně zemědělsky a lesnický obhospodařovaných oblastech, zvláště v rozsáhlých komplexech smrkových monokultur. Ustupuje například v níže položených částech nejsevernější Moravy (Beneš *et al.* 2002).

B. selene obývá dva základní typy stanovišť – jednak rozvolněné listnaté a smíšené lesy včetně pasek, úvozů, okolí lesních cest, lesních luk atd., včetně mezofilních pastvin s křovinami a rozvolněnými stromy a pak také na rašelinných loukách a rašeliništích (Beneš *et al.* 2002).

1.4 Ekologie a chování

1.4.1 Perleťovec mokřadní (*B. eunomia*)

B. eunomia je druh motýla, který přezimuje ve stádiu larvy. Vajíčka jsou kladena v červnu a larvy se líhnou asi za deset dní poté. Mladé housenky se přes den ukrývají v suchých, svinutých listech hadího kořene a žír provádějí pouze v noci (Beneš *et al.* 2002). Krmí se po dobu několika týdnů, dvakrát se svlékají a pak přezimují (Nève 1996; Waeyenbergh *et al.* 1996). Na jaře po přezimování se larvy přes den vyhřívají na osluněných místech, často více pohromadě, potravu přijímají opět v noci (Beneš *et al.* 2002). Housenka se před zakuklením ještě několikrát svléká (Nève 1996). U motýlů žijících v Ardenách bylo pozorováno, že tento druh ve stádiu kukly přetrvává 22 až 29 dní (Mass 1995). Imaga se líhnou na konci května nebo v červnu. Někteří autoři uvádějí, že housenka přezimuje dvakrát před zakuklením, což také svědčí o tom, že se opravdu jedná o glaciální relikv a jeho přizpůsobení na krátká letní období (Ebert & Rennwald 1991; Nève 1996).

Ve střední Evropě je druh zcela závislý na jedné hostitelské rostlině housenky – rdesno hadí kořen (*Polygonum bistorta*) (Descimon 1976; Ebert & Rennwald 1991; Nève 1996; Weiss 1967). Také život imaga je spojen s touto rostlinou, která slouží jako potravina. Za pět let pozorování v terénu po celou dobu letu *B. eunomia* v belgických Ardenách Nève (1996) zpozoroval jen dvakrát, že by dospělec přijímal potravu z jiné rostliny, než *P. bistorta*, a to na vrbovce bahenní (*Epilobium palustre*), fytoecologicky před přítomností květů *P. bistorta*, a podruhé na pcháči bahenní (*Cirsium palustre*) po rozkvětu *P. bistorta*. V Německu bylo jako živná rostlina také pozorováno rdesno živorodé (*Polygonum viviparum*) (Settele 2009) a u některých populací v Polsku klikva bahenní (*Vaccinium oxycoccos*) (Sielezniew, osobní sdělení).

Ke snůšce vajec dochází v červnu a jsou kladena ve skupinách po 3-19, obvykle na spodní listy živné rostliny. Občas jsou vajíčka kladena i na jiné druhy rostlin - štírovník bažinný (*Lotus uliginosus*), rozrazil rezekvítek (*Veronica chamaedrys*), bolševník obecný (*Heracleum sphondilium*) a kostřava červená (*Festuca rubra*), ale přesto v blízkosti rdesna hadího kořene (Goffart & Waeyenbergh 1994).

Nève (1996) uvádí, že hostitelskou rostlinou na jihu Norska je *P. viviparum*. Distribuce *P. bistorta* a *P. viviparum* v Evropě jsou v podstatě komplementární. Ve Finsku byly pozorovány jako hostitelské rostliny také *Viola palustris* a *Andromeda polifolia* (Marttila *et al.* 1990). *P. viviparum* je hlavní živnou rostlinou *B. eunomia* také v USA a Kanadě (Nève 1996). V USA byly jako živné rostliny dále pozorovány *Salix spp.* a *Viola spp.* (Lotts *et al.* 2015). V Kanadě Layberry *et al.* (1998) uvádí tyto živné rostliny - klikva bahenní (*Vaccinium oxycoccos*) a libavka *Gaultheria hispidula*.

B. eunomia je druh žijící v metapopulacích, přičemž jsou jednotlivé subpopulace propojeny migracemi dospělců přes nevhodná stanoviště. Období výskytu a mobilita se u samců a samic liší. Jedná se o protandrický, výrazně heliofilní druh, který je na místech svého výskytu hojný. Samice se rozmnožují pouze jednou za život a to krátce po vylíhnutí, oproti tomu samci se mohou pářit vícekrát za sezónu (Baguette & Nève 1994; Schtickzelle *et al.* 2002). Samci aktivně vyhledávají samice patrolováním a snaží se o páření při každém náhodném setkání se samicí. Po spáření se samice snaží vyhýbat samcům a věnují se hledání vhodného místa ke kladení (Baguette & Nève 1994).

Rozmnožovací chování je tedy hlavním faktorem ovlivňujícím disperzi dospělců (Baguette *et al.* 1998). V případě velké hustoty samic je pro samce nevýhodné investovat do přesunu mezi jednotlivými subpopulacemi – v době, kdy samci dosáhnou nové populace, je pravděpodobné, že jsou samice již spářeny (Baguette & Nève 1994). Naopak za vysoké hustoty samců disperze samic mezi subpopulacemi výrazně stoupá, je to způsobeno „dorážením“ samců na již oplozené samice, které pak nemají dostatečný prostor k hledání vhodného ovipozičního místa (Baguette *et al.* 1996; Baguette *et al.* 1998; Petit *et al.* 2001). Dalším možným důvodem je cíl najít lepší kvalitu prostředí pro krmení nebo kladení vajíček (Baguette & Nève 1994), případně může zvýšená migrace samic souviset s parazitací. V průběhu života samice kladou ve snůškách po 3 – 19 vajíčkách a distribuce potomků do různých subpopulací může být strategií, jak omezit rizika parazitice (Petit *et al.* 2001). Díky několika studiím se zdá, že samice mají větší sklony k pohybu mezi stanovišti než samci. Pohyb samic mezi stanovišti je tedy klíčovým faktorem vedoucím k toku genů

v metapopulaci a umožňuje (re)kolonizaci neobsazených stanovišť (Baguette & Nève 1994; Baguette *et al.* 1996, 1998; Petit *et al.* 2001).

B. eunomia je tedy druhem s relativně silnou kolonizační schopností na místní úrovni. Nicméně, vzhledem k jeho omezenému počtu a regionálnímu zmenšování lokalit, je tento druh v několika zemích ohrožený a je potřeba ho chránit pomocí správného managementu krajiny (Baguette & Nève 1994; Beneš *et al.* 2002).

1.4.2 Perlet'ovec dvanáctitečný (*B. selene*)

Vývoj *B. selene* je v nižších polohách dvougenerační (květen – červenec, srpen – září), v horách jednogenerační (červen – červenec). Vajíčka motýli kladou jednotlivě nebo v malých skupinkách na spodní stranu listů violek, často též na okolní suchý a výhřevný opad. Soliterních larvy se vyhýbají přímému slunci a po krátkém žíru na slunci se vždy rychle ukryjí do opadanky. Housenky často přelézají relativně dlouhé vzdálenosti mezi jednotlivými živnými rostlinami. Typické živné rostliny jsou z čeledi Violaceae, např. violka psí (*V. canina*), v. Rivinova (*V. riviniana*), v. srstnatá (*V. hirta*), v. bahenní (*V. palustris*). *B. selene* se kuklí v opadance, často pod stočenými suchými listy (Beneš *et al.* 2002).

Samci vyhledávají samice patrolováním. Jedinci jsou v rámci biotopů relativně mobilní, takže populace nemívají velkou denzitu. Imága se nejčastěji zdržují na místech s velkou nabídkou kvetoucích bylin. Často je lze pozorovat při sání na osluněné vlhké půdě (Beneš *et al.* 2002).

1.5 Fylogenetické vztahy a fylogeografie

Dle Simonsena *et al.* (2010) je rod *Boloria* s.l. monofyletický a vznikl v raném miocénu. K prvnímu štěpení v rámci rodu došlo ve středním miocénu mezi větví zahrnující sesterské podrody *Proclassiana* a *Clossiana* a větví tvořenou monofyletickým podrodem *Clossiana*. K rozdělení mezi *Proclassiana* a *Boloria* s.str., stejně jako k divergenci v rámci podrodu *Clossiana*, došlo v pozdním miocénu. Většina současných druhů vznikla v posledních 2 milionech let, tedy během pozdního pliocénu a v holocénu (Simonsen *et al.* 2010).

Boloria eunomia i *Boloria selene* jsou monofyletickými druhy. Genetický rozdíl mezi populacemi z Palearktického a Nearktického regionu je výrazně větší, než u zástupců ze stejného regionu. K divergenci mezi Nearktickými a Palearktickými populacemi *B. eunomia* došlo zhruba před 1,7 miliony let a u *B. selene* zhruba před 2,5 miliony let (Simonsen *et al.* 2010). Rozšíření motýlů mezi regiony pravděpodobně proběhlo přes tundru třetího pevninského mostu Beringovy úžiny, který existoval v době před 1,5 miliony let (Sanmartin

et al. 2001). Také však nelze zcela vyloučit možnost, že se na americký kontinent dostali migrací přes Atlantský nebo Tichý oceán (Simonsen *et al.* 2010; Vila *et al.* 2011). Detailnější fylogeografická studie obou druhů však chybí, dosud bylo analyzováno pouze několik vzorků z Evropy, jeden z Asie a několik ze Severní Ameriky (Mutanen *et al.* 2012).

Jedinou fylogeografickou studii zaměřenou na perlet'ovce mokřadního provedl Nève (1996). Tato práce byla založena na analýze alel různých evropských populací.

Výsledky naznačují, že původ populací ve Fénoskandinávii se výrazně liší od populací ve zbytku Evropy. Toto potvrzují získaná data nejen genetického, ale také ekologického charakteru (živné rostliny). Místní populace pravděpodobně pocházejí z orientálního refugia, což mají společné s dalšími druhy rašelinišť ve Skandinávii jako *Colias palaeno* nebo *Boloria aquilonaris* a *Oenis jutta* (Petersen 1956). Tyto druhy ukazují kontinuální rozšíření v boreální zóně palearktického regionu a obvykle se vážou na lesní rašeliniště a na keřovitou tundru (Mikkola *et al.* 1991). Jedna analýza distribuce motýlů čeledí Nymphaelidae a Noctuidae v boreální zóně ukazuje, že centrum diverzity boreální fauny obou skupin je v centrální Asii (Mikkola 1988; Varga 1977) a ne v jižní Evropě, jak naznačuje Mani (1968).

Analýza alel populací z různých regionů střední Evropy naznačuje afinitu ardenských a pyrenejských populací, které se dále liší od ostatních evropských populací. Populace v Ardenách se tedy podle Nèva (1996) rozšířila z refugia v jihozápadní Evropě, stejně jako populace v Pyrenejích. Populace v Ardenách mají nižší genetickou variabilitu než pyrenejské (zřejmě následek jevu „stepping stone“). Česká populace se liší od pyrenejské pouze v jedné alele, je tedy pravděpodobné, že sdílí původ ze stejného refugia, jako populace pyrenejské a ardenské (Nève 1996). Také pozdější výzkum Nèva *et al.* (2009) ukazuje vysoký stupeň polymorfismu u šumavských populací a shrnuje, že tato oblast byla rekolonizována spíše z Pyrenejí než z balkánské oblasti. Vysoký stupeň polymorfismu také indikuje kontinuální přežívání populací, pravděpodobně od konce posledního glaciálu (před 12 000 let) nebo ještě déle (Nève *et al.* 2009; Varga & Schmitt 2008). Polymorfismus zjevně klesá směrem na sever, populace v Ardenách jsou výrazně méně polymorfnní, než ty v jižních pohořích (Nève *et al.* 2008). Je to způsobeno tím, že v období vrcholu glaciálu druhy jako *B. eunomia* obývaly nížinné oblasti dnešní temperátní Evropy, kdežto místa se současným výskytem byla tehdy pokryta ledem. S ústupem ledovců byly severní oblasti kolonizovány *de novo*, což vedlo ke ztrátě genetické variability. Zatímco jižní horské populace urazily podstatně nižší vzdálenost posunem z nižších nadmořských výšek do výše položených oblastí (Varga & Schmitt 2008). Dále Nève (1996) objevil, že populace v Česku má jednu stejnou alelu,

jako populace v Norsku, což nevyklučuje hypotézu, že by mohla pocházet z refugia na Sibiři, není to však moc pravděpodobné.

Na lokalitu Morvan (Francie) byly populace introdukovány z Arden v letech 1970 a 1973 (Descimon 1976; Nève 1996). Kvůli efektu zakladatele ztratily část genetické variability původních populací. Všechny populace v Morvanu vznikly z původních 18 samic a není jisté, zda se všechny tyto samice rozmnožily. Tyto údaje naznačují, že ke ztrátě alel mohlo dojít v rámci kolonizačních událostí (Nève 1996).

Další výsledky této studie naznačují, že zóna kontaktu mezi populacemi se sibiřským a evropským původem je situována v Polsku, kde populace v Bělověžském pralese osidlují dvě různá stanoviště (rašeliniště a vlhké louky) a liší se fenotypem – tyto odlišné fenotypy byly popsány jako dva poddruhy *P. e. helmina* a *P. e. gieysztori* (Krzywicki 1967). Přítomnost poddruhu *P. e. gieysztori* na Ukrajině naznačuje, že pochází z refugia v této oblasti. Populace v severním Německu nemohou být a priori přiřazeny k tomuto refugiu (Nève 1996).

2 CÍLE PRÁCE

- Izolovat DNA ze vzorků sebraných z celého areálu rozšíření perleťovce mokřadního (*Boloria eunomia*) a druhu s podobným rozšířením perleťovce dvanáctitečného (*Boloria selene*)
- Získat sekvence mitochondriálních (COI) i nukleárních (Wingless, Arginine Kinasa) markerů
- Vypracovat fylogenetické a fylogeografické analýzy a srovnat mezi sebou jak různé geny, tak i různé druhy
- Odatovat biogeografické události (disperze/extinkce) a interpretovat v souvislosti s tehdejšími klimatem

3 METODIKA

3.1 Materiál

Pro studium fylogeografie druhů *B. eunomia* a *B. selene* jsem použila vzorky zahrnující velkou oblast areálu (Příloha 1). Veškerý materiál byl shromážděn školitelem (Z. Faltýnek Fric) za velké pomoci Gabriela Nèva, Jana Ch. Habela, Marcina Sielezniewa, Aloise Pavlíčka a Martina Konvičky. Zkoumané vzorky *B. eunomia* pocházejí ze Španělska, Francie, Belgie, Německa, Rakouska, České Republiky, Polska, Norska, Švédska, Finska, Bulharska, Běloruska, Ruska, Kanady a USA (Obrázek 5, 6).

U druhu *B. selene* jsem pracovala se vzorky z Francie, Německa, České republiky, Dánska, Běloruska, Rumunska, Polska, Švédska, Ruska, Kanady a USA (Obrázek 8, 9). Bohužel u jedinců *B. eunomia* z Ukrajiny a Mongolska a *B. selene* z Kazachstánu a Španělska se mi nepodařilo vyizolovat DNA.

3.2 Izolace dna

Tkáň pro izolaci DNA byla získána ze suchých vzorků a pro analýzu byly použity nohy nebo abdomen dospělců. DNA byla extrahována pomocí komerčního kitu Genomic DNA Mini Kit (Tissue) od firmy Geneaid. Bylo postupováno dle instrukcí od výrobce.

Do mikrozkušavky byla umístěna živočišná tkáň a následně bylo přidáno 200 μ l GT puftru. Materiál byl homogenizován pomocí mikropestle a ke vzniklé směsi bylo přidáno 20 μ l proteinázy K. Potom byla směs zvortexována a stočena. Takto připravený vzorek se inkuboval při teplotě 60 °C po dobu čtyř hodin.

Po uplynutí této doby bylo ke směsi přidáno 200 μ l GBT puftru a posléze byla umístěna alespoň na dvě hodiny zpět do inkubátoru. Poté bylo přidáno 200 μ l čistého etanolu a směs byla zvortexována a stočena. Dále byl do inkubátoru umístěn Ellution pufr, který je potřeba používat v dalších krocích postupu zahřátý.

Následně byla připravena GD kolonka a Collection Tube, do kolonky bylo napipetováno 620 μ l doposud vytvořené směsi. Vše bylo po dobu dvou minut centrifugováno. Collection Tube s kapalinou byla nahrazena novou čistou C. Tube. V dalším kroku bylo do kolonky přidáno 400 μ l W1 puftru a na třicet sekund byl vzorek centrifugován. Z Tube byla vylita tekutina a kolonka, do které se poté napipetovalo 600 μ l Wash puftru, byla vrácena zpět. Toto bylo centrifugováno nejprve třicet sekund a po vylití kapaliny další tři minuty.

Dále byla připravena čistá mikrozkuhavka, do které byla umístěna kolonka. Následně bylo přidáno 60 μ l Ellution pufru a třicet sekund centrifugováno.

V mikrozkuhavce by měla být izolovaná DNA.

3.3 PCR

Fragmenty DNA byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce – PCR. PCR byla provedena pro mitochondriální gen (COI) a dva jaderné geny (Wingless, Arginine Kinasa). Pro práci jsem použila primery běžně používané pro molekulární fylogenezi motýlů, vycházela jsem z prací Wahlberg & Wheat (2008) a Ugelvig *et al.* (2011a). Použité primery jsou shrnuty v Tabulce 1. Pro první část COI (COIa) byly použity primery hybLCO-hybHCO a primery hybRon-hybHCO. Pro nukleární gen Arginine Kinase byly použity primery ArginineF-ArginineR. A nakonec pro amplifikaci genu Wingless byly použity primery hybLepwg1-hybLepwg2.

PCR reakce probíhala v objemu 25 μ l. Jako reakční prostředí byla použita směs PCR H₂O a PPP Mastermix (Top-Bio). Na jednu reakci bylo použito 12,5 μ l PPP Mastermix, 8,6 μ l H₂O, 1 μ l reverse primeru, 1 μ l forward primeru a 1,9 μ l DNA. PCR probíhala ve dvou různých programech, nastavení teplot na termocykleru pro amplifikaci DNA je popsáno níže. Pro ověření, zda PCR reakce proběhla úspěšně, byla použita agarózová elektroforéza.

Průběh PCR programu pro amplifikaci COI a Wingless:

- 95°C po dobu 5 min
- 40 cyklů:
 - 94°C po dobu 30 s
 - 50°C po dobu 30 s
 - 72°C po dobu 1 min 30 s
- závěrečná extenze 72°C po dobu 10 min

Průběh PCR programu pro amplifikaci Arginine Kinasy:

- 95°C po dobu 5 min
- 40 cyklů:
 - 94°C po dobu 30 s
 - 55°C po dobu 30 s
 - 72°C po dobu 1 min 30 s
- závěrečná extenze 72°C po dobu 10 min

Tabulka 1 Použité primery

Gen	Část	Typ	Název	Sekvence
COI	1	F	HybLCO	5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG 3'
	1	R	HybHCO	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'
	1	F	HybRon	5' GGAGCYCCWGATATAGCTTTCCC 3'
	1	R	HybHCO	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'
Arginine	1	F	ArginineF	5' TNACYGARKCCARTAYAAG 3'
	1	R	ArginineR	5' TTGATSAGYTCRGCGATG 3'
Wingless	1	F	HybLepWG1	5' GGARTGYAARTGYCAYGGYATGTCTGG 3'
	1	R	HybLepWG2	5' ACTICGCARCACCARTGGAATGTRCA 3'

3.4 Elektroforéza

Výsledek PCR reakce byl vizualizován elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl připraven rozpuštěním 1,5 g agarózy v 98,5 ml 1x TAE pufru a rozeřtím v mikrovlnné troubě. Roztok byl nalit do připravené formy s hřebínkem a ponechán asi 30 min tuhnout. Na takto připravený gel se nanášelo 5 µl PCR produktu smíchaného s barvivem SYBR Green a do prvního otvoru se nanas marker (ladder). Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě při napětí 150 V po dobu 25 minut.

3.5 Sekvence a tvorba alignmentu

Produkty, které se po elektroforéze ukázaly jako úspěšné, byly zaslány pro sekvencování do firmy MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng/index/>). Cílené úseky DNA byly sekvenovány pouze v jednom směru.

Získané sekvence byly alignovány a zkontrolovány ručně v programu BioLign v4.0.6.2. Začátek a konec alignmentu byly zkráceny tak, aby všechny sekvence začínaly a končily ve stejné pozici.

3.6 Analýzy

3.6.1 BEAST – datování vzniku

Nejprve bylo nutné zvolit vhodný model substituce nukleotidů, což bylo provedeno v programu MrModeltest 2.2 (Nylander 2004), který pomocí algoritmu v programu PAUP srovnává nejrůznější modely a nejvhodnější vybírá na základě Akaikeho informačního kritéria (AIC) a hLRT. Tento model byl použit přes grafické rozhraní MrMTgui. Pomocí

obou kriterií vyšel jako nejvhodnější model GTR+I+ Γ (Generalised time-reversible model s proporcí invariantních míst a gamma distribucí).

Pro výpočet molekulárních hodin a času vzniku jednotlivých větví byl použit program BEAST v1.8.1 (Drummond *et al.* 2012). Pro určení kořene fylogenetického stromu a kalibračních bodů bylo nutné definovat outgroup. Pro tento účel byly použity sekvence z databáze NCBI vycházející z práce Simonsena *et al.* (2010) (Příloha 1): *Boloria caucasica* (Lederer, 1852), *B. chariclea* (Schneider, 1974), *B. euphrosyne* (Linnaeus, 1758), *B. kriemhild* (Strecker, 1879) a *B. thore* (Hübner, 1903). Ke kalibraci stromu bylo definováno šest uzlů. Prvním bodem bylo štěpení rodu *Boloria* na dvě hlavní větve (12,8 milionů let), druhým štěpení mezi větvemi zahrnující druhy *B. eunomia* a *B. caucasica* (10,1 milionů let), třetím bodem bylo odštěpení větve zahrnující druhy *B. chariclea*, *B. kriemhild*, *B. selene*, *B. euphrosyne* a *B. thore* (9,5 milionů let). Čtvrtým kalibračním bodem bylo odštěpení větve zahrnující *B. chariclea*, *B. selene*, *B. euphrosyne* a *B. thore* (9,1 milionů let), pátým bodem bylo štěpení druhů *B. thore* a *B. selene* (5 milionů let) a posledním šestým bodem bylo štěpení druhů *B. euphrosyne* a *B. chariclea* (6,3 milionů let). Ostatní hodnoty zůstaly defaultní. Byl použit substituční model GTR+ Γ , který vyšel jako druhý nejlepší a má méně parametrů než GTR+I+ Γ , takže spíše dojde ke konvergenci markovských řetězců u paralelních běhů. Molekulární hodiny byly nastaveny jako log-normal relaxed clock a jako speciální model Birth-Death Process. Analýzy proběhly v pěti bězích po 60 000 000 generací a samplingu 5 000 generací.

3.6.2 Haplotypové sítě

Haplotypové sítě byly zkonstruovány použitím programu TCS verze 1.2.1 (Clement *et al.* 2000), spojovací limit byl nastaven standardně na hodnotu 95%. Dále byly sítě upraveny v programu Adobe Illustrator a Adobe Photoshop CS2.

3.6.3 DNASP

Pomocí Tajima's D testu byla nejprve testována neutralita sekvencí mtDNA pro gen COI. Statistická signifikance tohoto testu neutrality byla vypočítána pomocí koalescentních simulací s 10 000 replikacemi v programu DNASP (Librado & Rozas 2009). Dále byla v tomto programu vypočítána haplotypová (genová) diverzita (h ; pravděpodobnost, že dva náhodně vybrané haplotypy ve vzorku se liší), nukleotidová diverzita (π ; pravděpodobnost, že dvě náhodně zvolené homologní nukleotidové pozice se liší) a počet polymorfních míst (S) v populacích (Příloha 2, 5). Pro zhodnocení genetické struktury mezi odlišnými

geografickými regiony a pro vyjádření stupně divergence mezi jednotlivými populacemi bylo rovněž v programu DNASP vypočítáno párové F_{ST} (Příloha 3, 6). Vyšší hodnoty fixačního indexu (F_{ST}) signalizují snížení genového toku mezi populacemi a poukazují na vliv genetického driftu, kterým se v subpopulacích fixují odlišné alely. Do některých analýz byly zahrnuty pouze populace s více jedinci, pro některé testy nebylo možno použít populace zastoupené pouze jedním vzorkem.

3.6.4 Arlequin

Dále byla v programu Arlequin 3.5 provedena hierarchická analýza molekulární variance – AMOVA (Excoffier *et al.* 2010). Pro tuto analýzu byli jedinci zařazeni do populací, které byly následně přiřazeny do geografických skupin. Výsledkem AMOVA by měla být identifikace zdroje variability na základě haplotypových frekvencí. Výsledky ukážou, zda je největší variabilita mezi geografickými skupinami, v populacích v rámci těchto skupin nebo v rámci jednotlivých populací. U druhu *B. eunomia* byly populace zařazeny do 8 geografických skupin: Skandinávie (pop. 4, 43, 50, 53-55), východ Evropy (pop. 3, 13-14, 26, 56-63), střední Evropa (6-8, 16, 34-40), západní Evropa (pop. 44-45, 51-52), jižní Evropa (pop. 41, 46-49), Bulharsko (pop. 42), Asie (pop. 1, 17-19, 21, 23-24, 28, 32-33) a SA (pop. 2, 5, 10-12, 15, 25). Pro druh *B. selene* byly definovány tyto geografické skupiny: Skandinávie (pop. 16), Dánsko (pop. 30-31), střední Evropa (pop. 4-15, 20, 26-29, 33-34), Francie (pop. 36), východ Evropy (pop. 19, 22), Asie (pop. 1, 23, 32), SA (pop. 2-3, 17-18, 21).

3.6.5 Mantelův test

Mantelovým testem (Mantel 1967) jsem testovala, jestli koreluje genetická a geografická vzdálenost. Pro tento test je třeba dvou matic. Jedna matice zahrnující genetické diferenciaci populací byla získána z programu DNASP (hodnoty F_{ST} pro COI). Druhá matice obsahuje přirozené logaritmy geografických vzdáleností (\ln vzdáleností) mezi dvojicemi populací a byla vyexportována z programu ArcView pomocí extenze „Distance Matrix v.1.1“. Mantelův test byl vypočítán v programovém balíku R i386 3.1.1. v package „vegan“ příkazem „mantel“ za použití 9999 permutací. Mantelův test byl proveden pouze pro druh *B. eunomia*. U druhu *B. selene* nebylo dostatečné množství populací použitelných pro tuto analýzu.

4 VÝSLEDKY

Do analýz byly zahrnuty sekvence první části genu COI mtDNA, získané ze 160 jedinců *Boloria eunomia*, 69 jedinců *Boloria selene* a 14 jedinců dalších druhů použitých jako outgroup (Příloha 1). Celkem se podařilo izolovat a amplifikovat DNA u 124 vzorků *B. eunomia* a u 47 jedinců *B. selene*. Zbylé sekvence byly použity z databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Příloha 1). Jednotlivé sekvence byly po úpravě a sjednocení zkráceny na 672 bp. Byly získány sekvence pro nukleární gen Arginine Kinase u 32 jedinců *B. eunomia*. Po úpravách činila výsledná délka alignmentu 557 bp. Dále se podařilo získat sekvence pro nukleární gen Wingless u 31 jedinců *B. selene*, kdy výsledná délka alignmentu činila 336 bp. Bohužel u některých vzorků se nepovedlo DNA amplifikovat, a proto nemohly být jejich sekvence zahrnuty v analýzách.

4.1 Haplotypové sítě (*B. eunomia*)

Haplotypová síť, doplněná mapami Holarktického regionu a Evropy, ilustruje fylogeografické vztahy populací druhu *B. eunomia* (Obrázek 5). Síť byla zkonstruována na základě 136 sekvencí genu pro COI o délce 562 bp. 24 vzorků bylo z analýzy vyřazeno kvůli špatným začátkům a koncům sekvencí. Celkem bylo identifikováno 35 haplotypů (H1-H35). Kruhy v síti mají různou velikost, což ilustruje počet jedinců v haplotypu. Na síti je patrné sdružení haplotypů do 8 skupin (G1-G8), které se shoduje se štěpením větví v kladogramu (Obrázek 7). Na obrázcích jsou pro lepší přehlednost tyto skupiny a lokality na mapách odlišeny barevně.

Haplotypová síť naznačuje, že centrum vzniku *B. eunomia* bylo pravděpodobně na východní Sibiři. Populace z Kanady a USA se odštěpily od sibiřských a tvoří samostatnou haplotypovou skupinu. Dále je patrná vysoká příbuznost ruských populací s populacemi z Norska a Švédska. Dochází zde ke sdílení haplotypů a vypadá to tedy, že Skandinávie byla kolonizována ze Sibiře, nikoli z jižní a střední Evropy. Dále síť naznačuje, že populace z Pyrenejí a Arden si jsou blíže příbuzné a liší se od zbylých evropských populací. Ze sítě je dále patrná příbuznost populací z Alp (Rakousko, Německo) a Šumavy v České republice a tyto populace byly odvozeny od bulharských. Výsledky analýzy dále ukazují příbuznost populací z jižního Finska, Běloruska, Uralu a části populací z Polska. Polsko by mohlo být kontaktní zónou, protože se zde setkává několik haplotypů z různých haplotypových skupin.

Druhá síť pro druh *B. eunomia* byla zkonstruována na základě 32 sekvencí genu pro Arginine Kinasu o délce 557 bp (Obrázek 6). Bohužel pro více vzorků se zatím DNA nepodařilo amplifikovat, i přesto však byly do této analýzy zahrnuty vzorky v podstatě z celého Holarktu. Celkem bylo identifikováno 12 haplotypů (H1-H12) a byly charakterizovány 3 haplotypové skupiny (G1-G3). První skupinu tvoří haplotypy populací z Ruska (Čukotka, Altaj, Jakutsko), opět je zde patrná příbuznost se skandinávskými populacemi z Norska a Finska. Další samostatnou skupinu tvoří vzorky ze Severní Ameriky (H5). Ze sítě je patrná afinita populací z Německa, Běloruska, Španělska a Uralu, které sdílejí společný haplotyp (H1). Od tohoto centrálního haplotypu jsou odvozeny další – H2, ukazující příbuznost populací z České republiky a Bulharska a haplotyp H4, který je důkazem příbuznosti populací z Arden a francouzské lokality Morvan. Celkově haplotypová síť pro Arginine Kinasu nevykazuje takovou strukturovanost jako síť pro COI.

4.2 Fylogenetický strom a molekulární datování (*B. eunomia*)

Získaný strom a molekulární datování byly vytvořeny pomocí Bayesovské analýzy v programu BEAST 1.8.1. Likelihood modelu byl -4455,45. Jako nejlepší byl vybrán strom s nejvyšší logaritmicou kredibilitou -840,22.

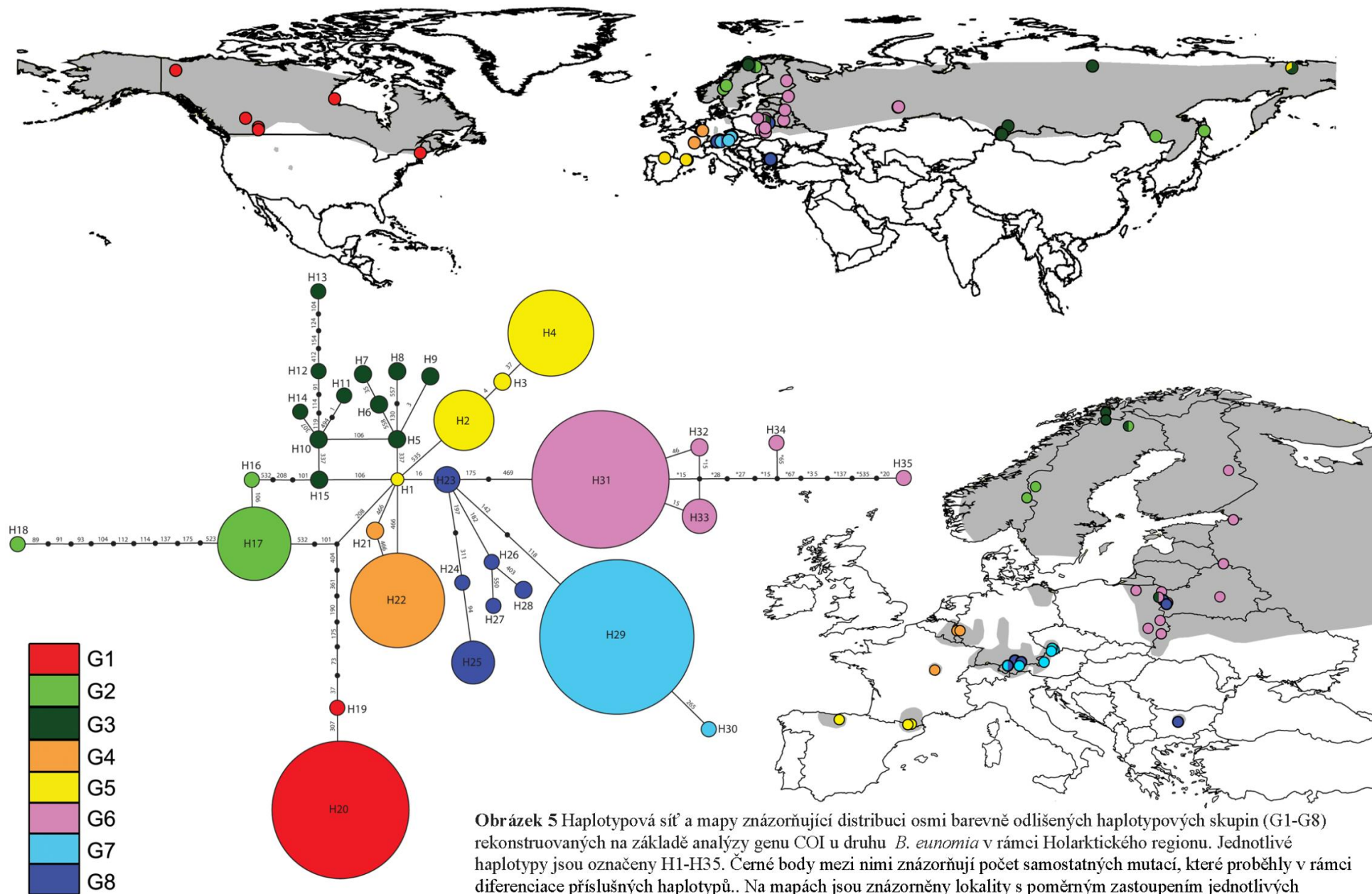
Na kladogramu jsou znázorněny vztahy mezi jednotlivými vzorky *B. eunomia* – celkem 160 sekvencí (Obrázek 7). Fylogenetický strom naznačuje přítomnost stejných haplotypových skupin (G1-G8) jako haplotypová síť (Obrázek 5). Pro lepší přehlednost jsou skupiny barevně rozlišeny a doplněny o lokality, odkud vzorky pocházejí. Co se týče topologie stromu, tak z vybraných outgroups jsou *B. eunomia* nejbližší druhy *B. caucasica* a *B. kriemhild*.

B. eunomia je monofyletickým druhem, který pravděpodobně vznikl před 7,1 miliony let. V rámci druhu se skupina, zahrnující zástupce ze Severní Ameriky (G1), jeví jako sesterská ke všem ostatním a k jejímu odštěpení od zbylých palearktických zástupců došlo zhruba před 3,2 miliony let.

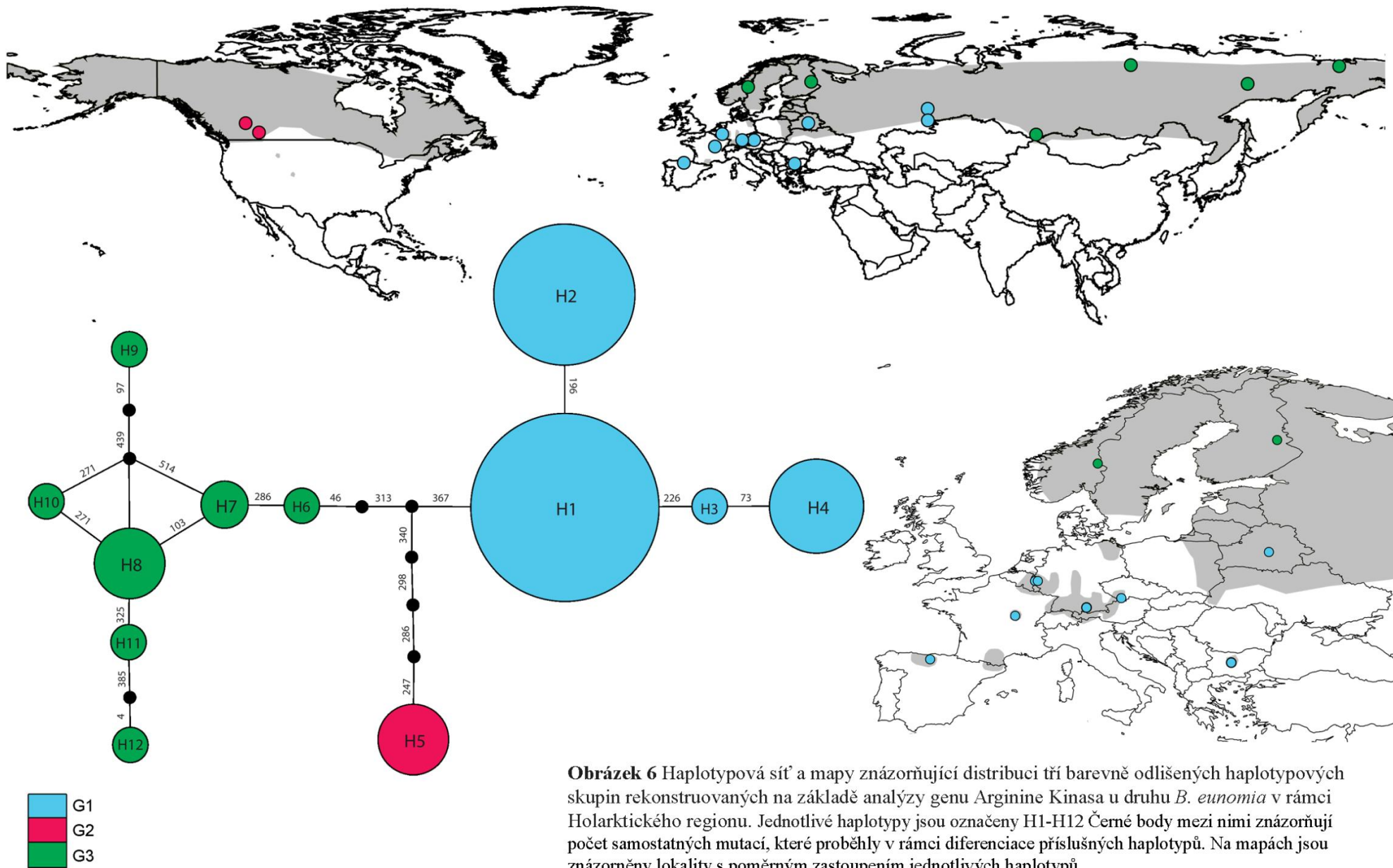
V rámci palearktické větve se nejprve odštěpuje skupina (G2) se zástupci z východního Ruska (Chabarovsk, Sachalin), Švédska a Norska, která je sesterská ke všem ostatním z Palearktu. K této události došlo asi před 1,7 miliony let. Dále zhruba před 1,4 miliony let došlo k rozštěpení zbývajících eurasijských skupin na dvě hlavní větve. První je tvořena haplotypovými skupinami G3, G4 a G5. Skupina G3 je sesterská vůči zbývajícím dvěma a zahrnuje vzorky z Ruska (Čukotka, Altaj, Jakutsko), z východního Polska, Švédska a Norska a k jejímu odštěpení došlo nejspíš před 1,1 miliony let. Před asi 0,7 miliony let se

odštěpila skupina G4 zahrnující populace z Arden a skupina G5, tvořená převážně vzorky z Pyrenejí (Španělsko, Francie).

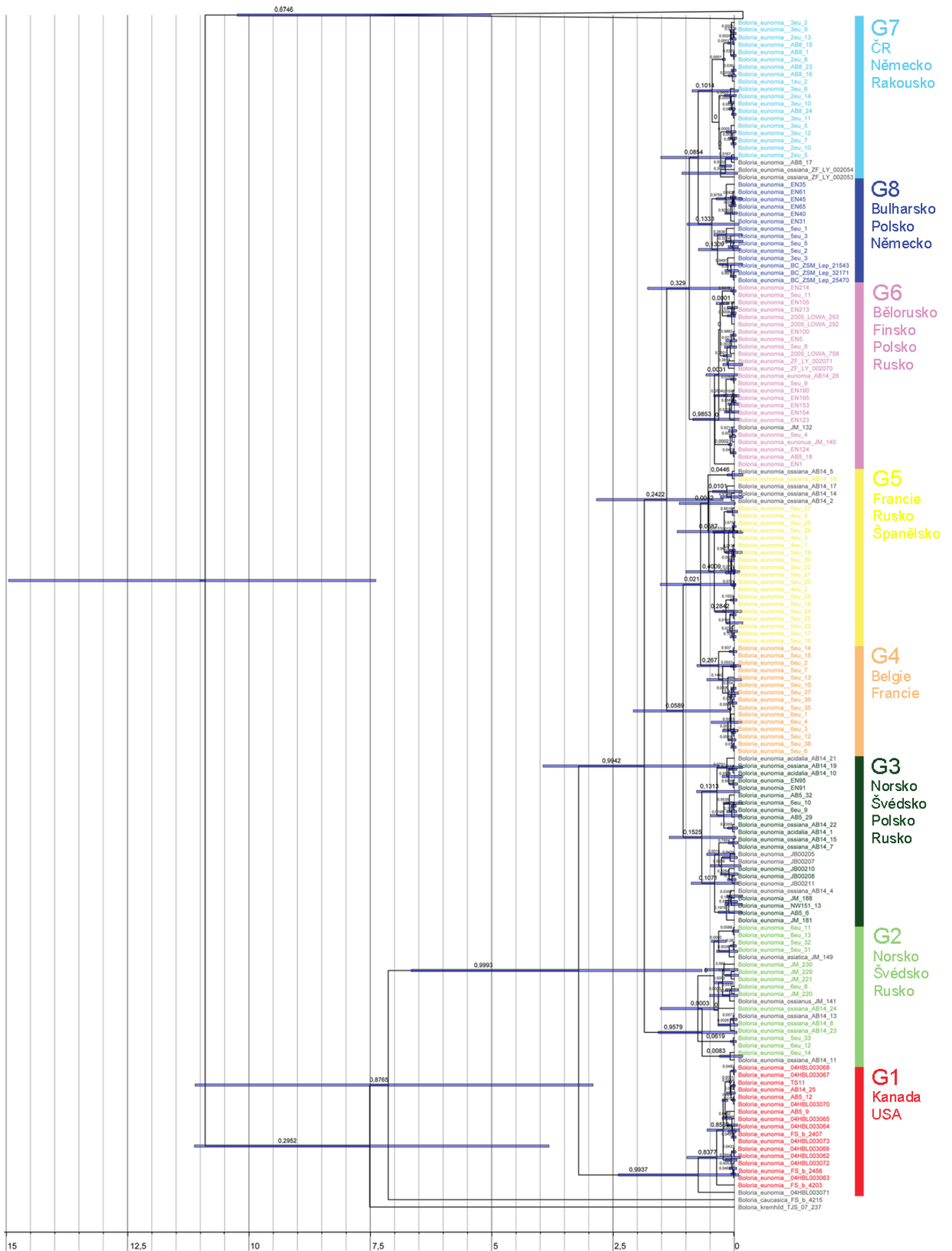
Poslední velkou izolovanou eurasijskou větev tvoří skupiny na kladogramu, označené jako G6, G7 a G8. Skupina G6 je sesterská zbývajícím dvěma a oddělila se zhruba před 0,9 miliony let. Patří sem vzorky z populací žijících v Rusku (Ural), Bělorusku, východním Polsku a Finsku. A nakonec skupiny G7 (ČR, Německo, Rakousko) a G8 (Bulharsko, Polsko, Německo) se diferencovaly asi před 0,6 miliony let.



Obrázek 5 Haplotypová síť a mapy znázorňující distribuci osmi barevně odlišených haplotypových skupin (G1-G8) rekonstruovaných na základě analýzy genu COI u druhu *B. eunomia* v rámci Holarktického regionu. Jednotlivé haplotypy jsou označeny H1-H35. Černé body mezi nimi znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciace příslušných haplotypů. Na mapách jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



Obrázek 6 Haplotypová síť a mapy znázorňující distribuci tří barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě analýzy genu Arginine Kinasa u druhu *B. eunomia* v rámci Holarktického regionu. Jednotlivé haplotypy jsou označeny H1-H12 Černé body mezi nimi znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciace příslušných haplotypů. Na mapách jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



Obrázek 7 Datování fylogenetických událostí druhu *Boloria eunomia*. Osa X udává stáří v milionech let, modré úsečky označují 95% HPD interval, čísla nad větvemi označují podporu. Fylogenetický strom naznačuje přítomnost stejných haplotypových skupin (G1-G8) jako haplotypová síť (Obrázek 5). Pro lepší přehlednost jsou skupiny barevně rozlišeny.

4.3 Populačně genetické analýzy (*B. eunomia*)

Do populačních analýz pro druh *B. eunomia* bylo celkem zahrnuto 136 jedinců náležících do 57 populací. Tajima's D test nevyšel signifikantně: $D = -0,941$; $P\text{-value} = 0,181$. To znamená, že se v daném úseku neprojevila žádná selekce a dataset je vhodný pro další populační analýzy.

Celkově bylo detekováno 29 polymorfních míst, nukleotidová diverzita vyšla 0,009 a halotypová diverzita byla 0,903. Hodnoty pro jednotlivé populace jsou znázorněny v Příloze 1. Vysoké hodnoty haplotypové a nukleotidové diverzity měly populace z Ruska (Altaj, Čukotka, Sachalin, Ural), ale také populace z Německa, Polska, Švédska a Belgie. U zbylých populací vycházely tyto hodnoty nulové.

Pomocí výpočtu F_{ST} byla u populací zjištěna velmi vysoká genetická diferenciace (Příloha 3). 64,5% hodnot F_{ST} bylo vyšších než 0,8, oproti tomu pouhých 12,3% hodnot bylo nižších než 0,3. Tyto výsledky naznačují, že ačkoliv je *B. eunomia* široce rozšířený druh, genový tok mezi populacemi je nízký. Hodnoty F_{ST} , stejně jako výsledky z haplotypové sítě a Bayesovské analýzy, ukazují vysokou izolovanost severoamerických populací od euroasijských. Opět je zde patrná afinita populací ze severní Evropy a Sibiře, dále příbuznost polských, finských a západoruských populací. Hodnoty dále ukazují příbuznost populací rakouských, německých a českých. Celkově je zde vidět velká příbuznost sibiřských populací se všemi ostatními, což opět naznačuje, že tento druh pochází právě z této oblasti.

Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) pro *B. eunomia* ukazují, že celková hodnota variance je 0,489 (49%). Mezi geografickými skupinami vyšla variance nejvyšší 52,49%, variance mezi populacemi ve skupinách byla 28,3% a variance v rámci populací pouze 19,21% (Tabulka 2).

Tabulka 2 Analýza molekulární variance *B. eunomia* (Weir & Cockerham 1984; Excoffier *et al.* 1992; Weir 1996)

Zdroj variance	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Procento variability	Φ statistika
Mezi skupinami	7	33,869	0,25652 V_a	52,49	$\Phi_{CT} = 0,52487$
Mezi skupinami uvnitř skupin	49	19,648	0,13833 V_b	28,3	$\Phi_{sc} = 0,59570$
Uvnitř populací	79	7,417	0,09388 V_c	19,21	$\Phi_{ST} = 0,80791$
Celkem	135	60,934	0,48873		

Dále byl na základě dvou matic proveden Mantelův test. Matice párového F_{ST} zde byla porovnávána s maticí geografických vzdáleností jednotlivých populací. Test vyšel signifikantní: korelační koeficient $R = 0,147$; $P\text{-value} = 0,0283$. Výsledek ukazuje na korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností populací *B. eunomia*.

4.4 Haplotypové sítě (*B. selene*)

Haplotypové sítě, opět doplněné mapami holarktického regionu a Evropy, ilustrují fylogeografické vztahy populací dalšího zkoumaného druhu *B. selene* (Obrázek 8). Sítě byly zkonstruovány na základě 55 sekvencí genu pro COI o délce 572 bp. Z celkového datasetu 69 vzorků muselo být 14 vyřazeno kvůli špatným začátkům a koncům sekvencí. Bylo identifikováno 29 haplotypů (H1-H29). Velikost kruhů v sítích znázorňuje počet jedinců v haplotypu. Haplotypy pro druh *B. selene* můžeme rozdělit do tří skupin (G1-G3). Tyto skupiny se ovšem zcela neztotožňují s výsledky Bayesovské analýzy z BEASTU (Obrázek 10). Na obrázcích, stejně jako u *B. eunomia*, jsou skupiny a lokality pro lepší přehlednost na mapách odlišeny barevně.

Pro Palearktický region je typický velký, centrální haplotyp (H1), tvořený zástupci populací z velké části areálu rozšíření *B. selene*, konkrétně z Německa, Rumunska, Švédska, České republiky a Ruska (Altaj, Sankt Petěrburg). Z centrálního haplotypu jsou odvozeny dílčí z Rumunska, Dánska, České republiky, Německa, Francie Běloruska a dalších oblastí Ruska (Ural, Magadan) a také poslední skupina (G2), která je tvořena především haplotypy z České republiky a Dánska. Severoamerické haplotypy *B. selene* tvoří samostatnou síť, přičemž není patrný rozdíl mezi haplotypy z Kanady a USA.

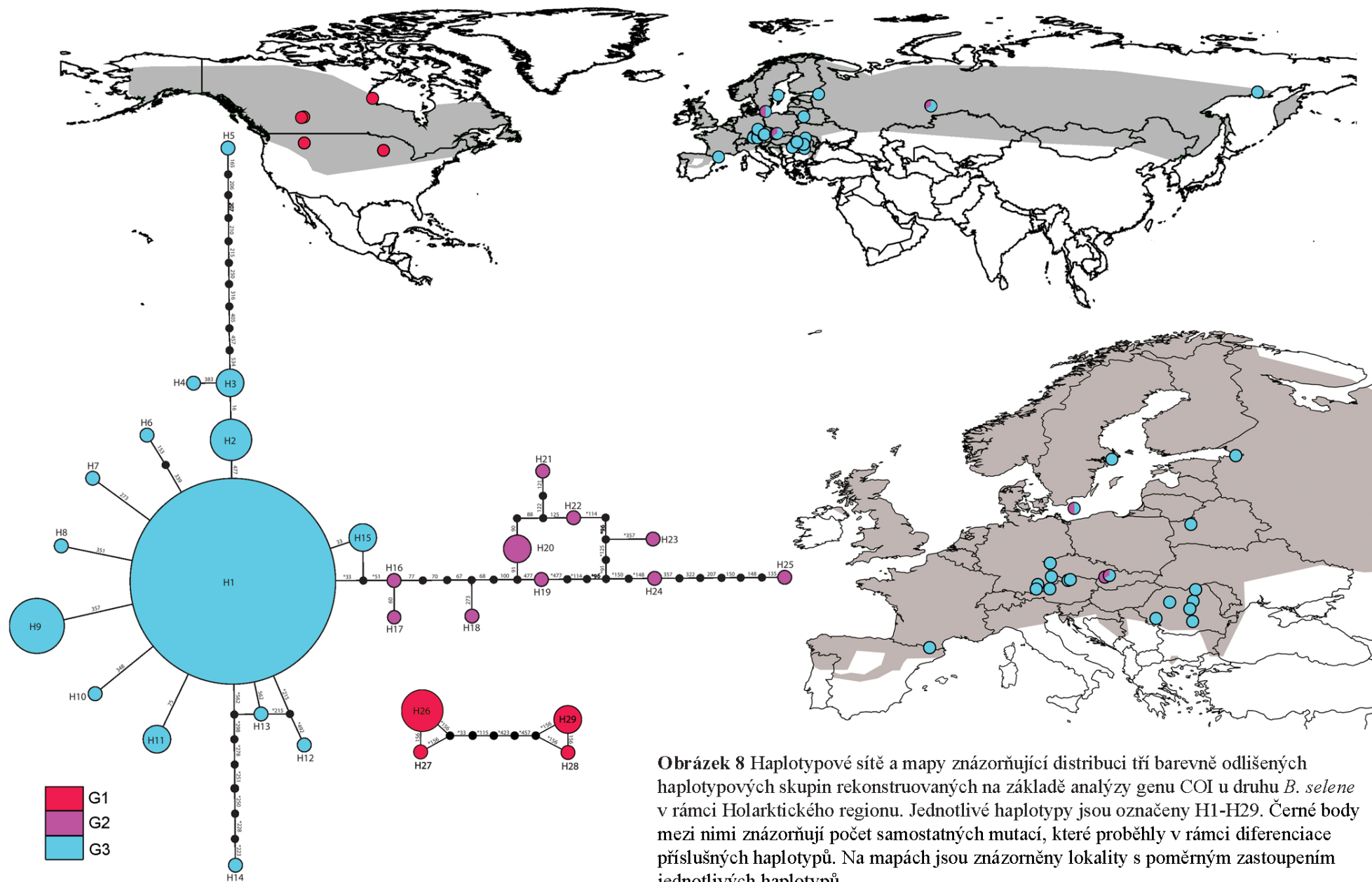
Na první pohled je tedy patrné, že haplotypové sítě pro druhy *B. eunomia* a *B. selene* mají zcela odlišný charakter.

Druhá síť pro druh *B. selene* byla zkonstruována na základě 31 sekvencí genu pro Wingless o délce 336 bp (Obrázek 9). Bohužel pro více vzorků se zatím DNA nepodařilo amplifikovat, i přesto však byly do této analýzy zahrnuty vzorky z velkého areálu. Celkem bylo identifikováno 19 haplotypů (H1-H19), byla charakterizována pouze jedna haplotypová skupina (G1). I pro nukleární marker je typický centrální haplotyp (H1) s odvozenými dílčími haplotypy. Do centrálního haplotypu se sdružují populace z České republiky, Dánska, Polska a Švédska. Vyšší haplotypová strukturovanost je patrná pouze u českých populací. Jediným výrazným rozdílem oproti mtDNA jsou populace z Kanady, které nejeví velkou genetickou odlišnost od populací palearktických.

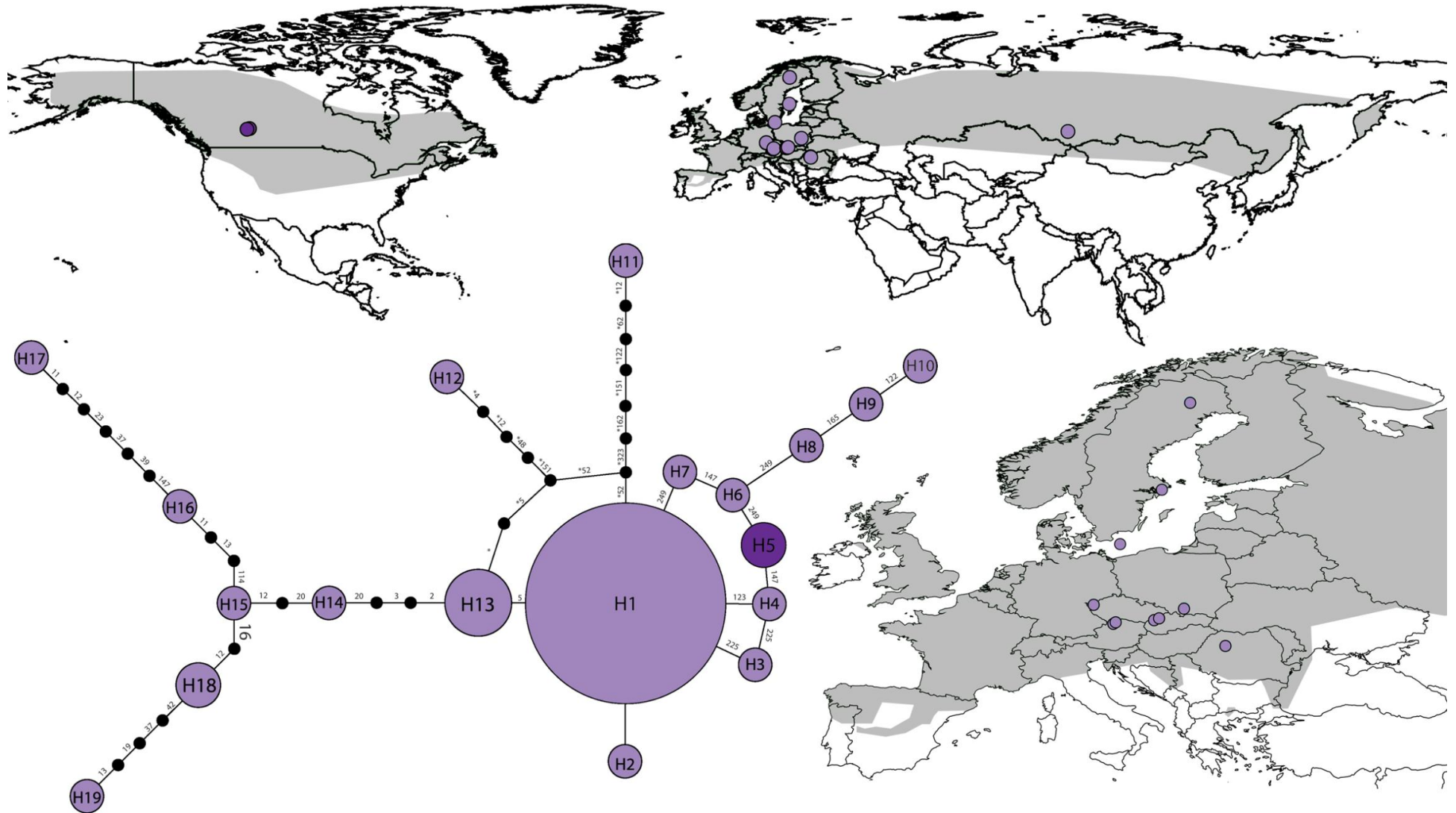
4.5 Fylogenetický strom a molekulární datování (*B. selene*)

Získaný strom a molekulární datování byly vytvořeny pomocí stejné analýzy jako pro druh *B. eunomia*. Na kladogramu jsou znázorněny vztahy mezi jednotlivými populacemi *B. selene* – celkem 69 sekvencí (Obrázek 10). Na rozdíl od *B. eunomia* topologie stromu *B. selene* zcela neodpovídá rozložení haplotypových skupin v síti. Pro lepší přehlednost jsou skupiny opět barevně rozlišeny a doplněny o lokality, odkud vzorky pocházejí. Z vybraných outgroups je *B. selene* nejbližší druh *B. thore*. *B. selene* pravděpodobně vznikl před 4,8 miliony let. Nejprve došlo k oddělení severoamerické větve zhruba před 3,2 miliony let, která je sesterská všem jedincům z Eurasie.

V rámci Palearktického regionu většina jedinců z České republiky a Dánska tvoří samostatné větve. Největší větev, která se oddělila asi před 0,7 miliony let, je tvořena vzorky ze všech zmíněných zemí a vztahy mezi nimi jsou nejasné.

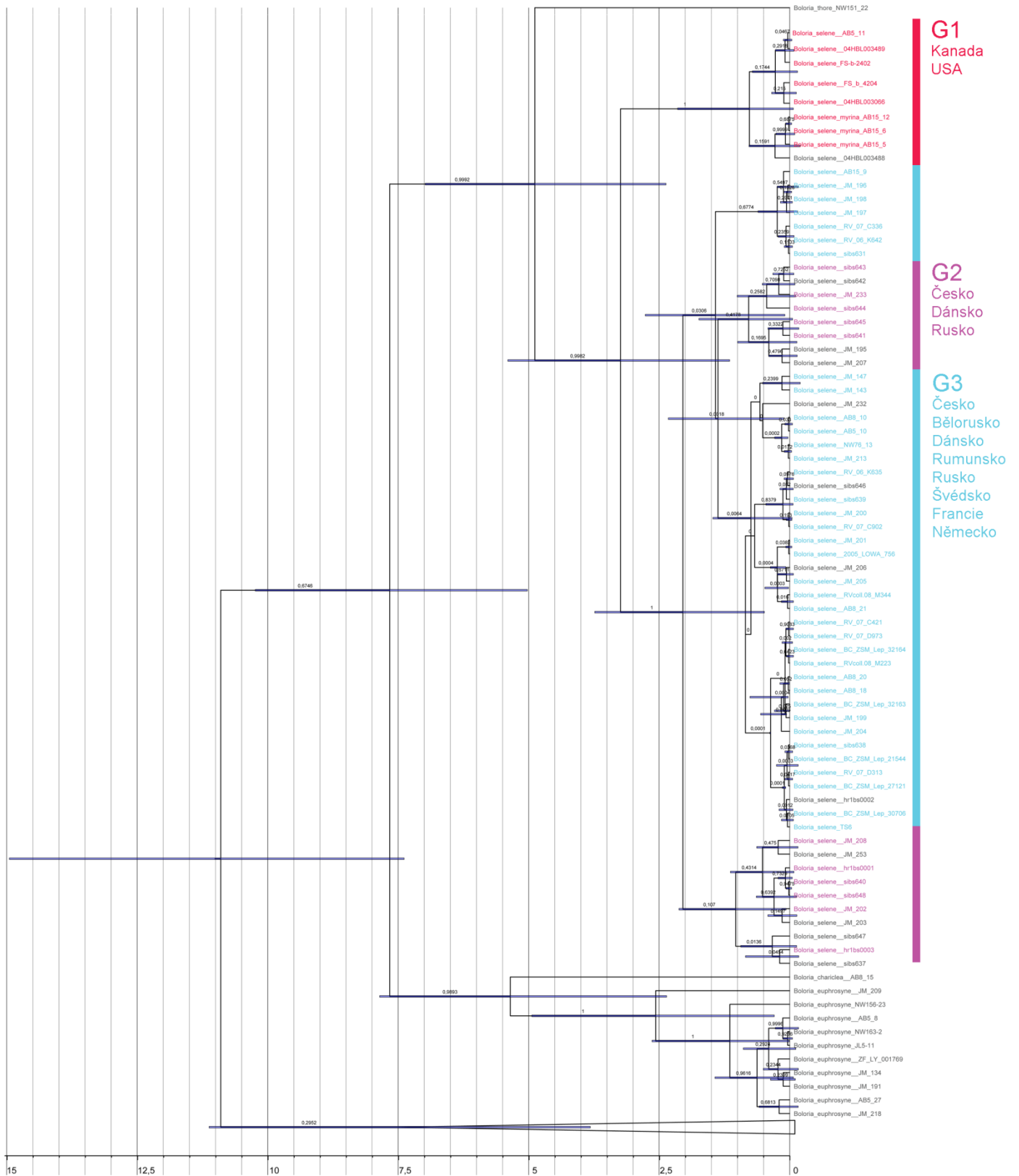


Obrázek 8 Haplotypové sítě a mapy znázorňující distribuci tří barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě analýzy genu COI u druhu *B. selene* v rámci Holarktického regionu. Jednotlivé haplotypy jsou označeny H1-H29. Černé body mezi nimi znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciacce příslušných haplotypů. Na mapách jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



■ G1

Obrázek 9 Haplotypová síť a mapy znázorňující distribuci jedné haplotypové skupiny rekonstruované na základě analýzy genu *wingless* u druhu *B. selene* v rámci Holartického regionu. Jednotlivé haplotypy jsou označeny H1-H19. Černé body mezi nimi znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciace příslušných haplotypů. Na mapách jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



Obrázek 10 Datování fylogenetických událostí druhu *Boloria selene*. Osa X udává stáří v milionech let, modré úsečky označují 95% HPD interval, čísla nad větvemi označují podporu. Barevné označení odpovídá haplotypovým skupinám (G1-G3), které jsou zobrazeny na Obrázku 8.

4.6 Populačně genetické analýzy (*B. selene*)

Pro druh *B. selene* bylo do analýz zahrnuto 55 jedinců patřících do 33 populací. Tajima's D test vyšel: $D = -1,172$; $P\text{-value} = 0,116$, což je statisticky nesignifikantní. To znamená, že stejně jako u předchozího druhu se v daném úseku neprojevila žádná selekce a dataset je vhodný pro další populační analýzy.

Celkově bylo detekováno 24 polymorfních míst, nukleotidová diverzita byla 0,015 a halotypová diverzita byla 0,736. Hodnoty pro jednotlivé populace jsou znázorněny v Příloze 5. Pomocí výpočtu F_{ST} byla u populací zjištěna velmi vysoká genetická diferenciace mezi Nearktickým a Palearktickým regionem (Příloha 6). V rámci Palearktického regionu však byla diferenciace nízká, což naznačuje, že mezi populacemi dochází k velkému genovému toku.

Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) pro *B. selene* ukazují, že celková hodnota variance je 0,483 (48%). Mezi geografickými skupinami vyšla variance velmi nízká 2,36% , variance mezi populacemi ve skupinách byla 19,67% a nejvyšší variance vyšla v rámci populací 77,97% (Tabulka 3).

Výsledky populačně genetických analýz korespondují s výsledky z haplotypových sítí a Bayesovské analýzy.

Tabulka 3 Analýza molekulární variance *B. eunomia* (Weir & Cockerham 1984; Excoffier *et al.* 1992; Weir 1996)

Zdroj variance	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Procento variability	Φ statistika
Mezi skupinami	6	3,608	0,01140 Va	2,36	$\Phi_{CT} = 0,02359$
Mezi skupinami uvnitř skupin	25	13,362	0,09504 Vb	19,67	$\Phi_{SC} = 0,20143$
Uvnitř populací	23	8,667	0,37681 Vc	77,97	$\Phi_{ST} = 0,22026$
Celkem	54	25,636	0,48325		

5 DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo dozvědět se více o pleistocénní historii glaciálního reliktu *Boloria eunomia* a srovnat jeho fylogeografii s fylogeografií podobně rozšířeného, avšak běžnějšího druhu *Boloria selene*. Stejně jako v mnoha dalších studiích, zabývajících se podobnou tematikou (Besold *et al.* 2008, 2015; Kodandaramaiah *et al.* 2011, 2012; Theissinger *et al.* 2011, 2013; Wahlberg & Saccheri 2007), byly v našich analýzách použity fylogenetické, fylogeografické a populačně genetické přístupy a bylo pracováno s mitochondriálními i nukleárními markery.

5.1 Fylogeografická historie perleťovce mokřadního (*Boloria eunomia*)

Mitochondriální markery (COI) v této práci potvrdily monofyletický původ druhu *Boloria eunomia* a v rámci areálu rozšíření odhalily vysoký stupeň fylogeografické strukturovanosti. Bylo identifikováno osm geograficky oddělených haplotypových skupin. Podobně vysoká genetická diferenciacce byla nalezena u dalších eurasijských motýlů (Gratton 2006; Vandewoestijne *et al.* 2004; Wahlberg & Saccheri 2007), což ukazuje na nízký genový tok mezi populacemi. Největší genetická variabilita byla zjištěna mezi geografickými skupinami (52,49%).

V Bayesovské analýze se na bázi štěpí populace z východní a střední Asie, centrum vzniku *B. eunomia* tedy pravděpodobně bylo někde v této oblasti. Tento výsledek je podobný zjištění Simonsena *et al.* (2010), který uvádí střední/východní Asii jako původní areál pro celý rod *Boloria*. Je známo, že i mnohé další druhy s holarktickým rozšířením mají původ ve východní Asii, odkud expandovaly do zbytku Eurasie a Ameriky (Kodandaramaiah *et al.* 2010; Todisco *et al.* 2010; Ugelvig *et al.* 2011b; Wahlberg & Rubinoff 2011). Časy disperze se mohou mezi druhy lišit dle různých nároků na klimatické podmínky (Vila *et al.* 2011; Todisco *et al.* 2012).

V případě *B. eunomia* došlo k oddělení amerických populací zhruba před 3,2 miliony let, toto období však neodpovídá výsledkům předchozí fylogenetické studie Simonsena *et al.* (2010), kde vyšlo štěpení mezi kontinenty zhruba před 1,7 miliony let. Je však třeba poznamenat, že u motýlů i ostatního hmyzu kalibrace fylogenetického stromu podléhá díky chybějícímu fosilnímu záznamu velké chybovosti. Získaná data divergencí lze tedy brát pouze jako přibližné odhady, které nám v historii druhu poskytují hrubý časový rámec hlavních evolučních událostí (Dinca *et al.* 2013). Dále z našich analýz vyplývá, že se motýl pravděpodobně dostal na severoamerický kontinent prostřednictvím druhého pevninského

mostu v Beringově úžině (Sanmartín *et al.* 2001). Nikoliv třetího, což by odpovídalo molekulárnímu datování dle Simonsena *et al.* (2010). V obou případech však také nelze vyloučit migraci přes oceán (Vila *et al.* 2011). Zjištěná vysoká genetická diferenciace mezi oběma regiony nejspíš souvisí s různými ekologickými podmínkami, kterým se musel motýl v průběhu času přizpůsobit (Hope *et al.* 2013). Nejspíš to však nemá nic společného s jednou z živných rostlin *Polygonum vivipara*, u které nebyla zjištěna výrazná genetická diferenciace v rámci celého holarktického areálu rozšíření (Marr *et al.* 2013).

V rámci Palearktického regionu se zhruba před 1,7 miliony let nejprve oddělily populace ze střední a východní Asie (Sibiř a Dálný Východ) společně s populacemi ze severní Evropy (Norsko, Švédsko). Příbuznost těchto geograficky vzdálených populací je z fylogeografického hlediska velice zajímavá. V našich analýzách je potvrzena mitochondriálními i nukleárními markery a odpovídá také výsledkům studie Nèva (1996). I u dalších motýlů krom *B. eunomia* byla popsána rekolonizace této oblasti z východu (Sibiře); například u druhů *Colias palaeno*, *Boloria aquilonaris*, *Melitaea cinxia* a *Oeneis jutta* (Mikkola *et al.* 1991; Wahlberg & Saccheri 2007). Avšak u chladomilných organismů můžeme pozorovat různé fylogeografické patery týkající se (re)kolonizace Fenoskandie. Po ústupu ledovců ze Skandinávie sloužila v několika případech velká evropská pohoří (Alpy, Karpaty, balkánské hory) jako zdrojové oblasti pro rekolonizaci severu (Mardulyn *et al.* 2009; Ronikier *et al.* 2012; Theissinger *et al.* 2013). Také u mnohých evropských motýlů je rekolonizace Fenoskandie z jižní a střední Evropy nejčastěji popisovaným fylogeografickým paternem (Dennis & Schmitt 2009; Habel *et al.* 2010). Že u *B. eunomia* a dalších organismů došlo k rekolonizaci severní Evropy ze Sibiře, může být způsobeno tím, že Asie byla oproti Evropě podstatně méně zasažena dobami ledovými (Svendsen *et al.* 2004) a organismy zde měly přístup do více refugií, odkud se mohly následně šířit (Tiffney 1985).

K oddělení všech ostatních palearktických populací došlo zhruba před 1 milionem let a dalším z fylogeografického hlediska zajímavým výsledkem je, že se na území Polska setkává několik haplotypů z různých haplotypových skupin. Což by ukazovalo, že Polsko může být kontaktní oblastí pro různé linie *B. eunomia*. Toto zjištění opět odpovídá předchozím výsledkům studie Nèva (1996). Polsko jako kontaktní zóna bylo popsáno i u dalšího druhu babočkovitých *Melitea cinxia* (Wahlberg & Saccheri 2007) a podporuje to i na právě tomto území zjištěný vysoký stupeň polymorfismu u druhu *Plebejus argus* (Sielezniew *et al.* 2011). Ani Polsko však nebylo rekolonizováno z jihozápadní a střední Evropy. Haplotypová síť (Obrázek 5) ukazuje, že polské populace jsou odvozeny od bulharských a

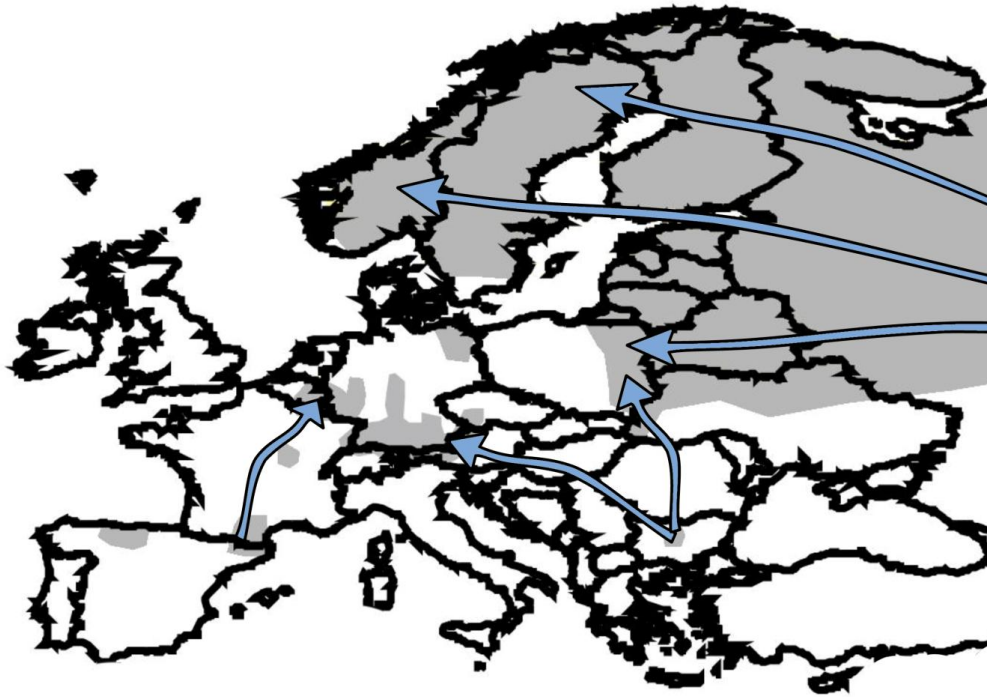
sibiřských. Výsledky dále naznačují vysokou afinitu polských populací s finskými, běloruskými a populacemi ze západního Ruska.

Bulharské populace daly pravděpodobně vzniknout i populacím středoevropským (Česká republika, Německo, Rakousko), mezi kterými je patrná vysoká příbuznost. Tento výsledek se liší od zjištění Nèva (1996), podle kterého byly středoevropské populace odvozeny od populací z jihozápadní Evropy.

Dalé výsledky ukazují, že populace ze střední Evropy nemají s polskými z hlediska genetického moc společného. Dalo by se tedy usuzovat, že k rekolonizaci z Bulharska došlo nezávisle vícekrát. Stejný latitudinální posun z Balkánského poloostrova můžeme pozorovat i u mnohých dalších organismů (Hewitt 2004; Schmitt 2007).

Co se týká jižní a západní Evropy, tak analýzy ukázaly vysokou příbuznost populací ze Španělska, Francie a Belgie, avšak poměrně znatelnou diferenciaci těchto populací od ostatních evropských. Populace z francouzské lokality Morvan jsou vysoce příbuzné s ardenskými a je to díky tomu, že do Morvanu byl motýl právě z Belgie nedávno reintrodukovan. V případě *B. eunomia* můžeme Iberský poloostrov jako zdrojové místo rekolonizace zamítnout, v haplotypové síti to naznačuje okrajová pozice pyrenejských populací.

B. eunomia převyšuje svou haplotypovou strukturovaností (COI) mnohé doposud studované eurasijské motýly (Vandewoestijne *et al.* 2004; Wahlberg *et al.* 2005; Weingartner *et al.* 2006). Ve srovnání s vysoce mobilní *Aglais urticae* (Vandewoestijne *et al.* 2004) tato variabilita naznačuje silný fylogeografický signál, související s migrací na krátkou vzdálenost (Hanski *et al.* 1994; Hanski 1999) a habitatovou specifitou. Naše výsledky naznačují, že *B. eunomia* mohla být v průběhu posledního milionu let kontinuálně rozšířena, a následkem lokální populační dynamiky (Hanski 1999; Ehrlich & Hanski 2004) a mnohonásobné izolaci interglaciálních refugií, bylo mnoha haplotypům umožněno přetrvat cykly populačních expanzí a kontrakcí. Doby ledové tedy nemusely být až tak nepříznivým obdobím (Stewart 2001, 2010) a mnohé druhy měly populace kontinuálně a široce rozšířené i mnohem dál na jih, než je tomu dnes. Toto například dokazují studie na dalších chladnomilných organismech (Dalen *et al.* 2007 – polární lišky; Svenning *et al.* 2008 – stromy; Zygouris *et al.* 2013 – rosomáci). Druhou hypotézou, vysvětlující vysokou diferenciaci mezi populacemi, může být, že k jejich oddělení došlo již před dlouhou dobou a ani v průběhu střídání glaciálů a interglaciálů nedošlo mezi populacemi ke genovému toku.



Obrázek 11 Hypotetické postglaciální kolonizační cesty perleťovce mokřadního (*B. eunomia*) zhruba před 1 milionem let a dříve

5.2 Porovnání mitochondriálních a nukleárních markerů

Co se týká výsledků získaných pomocí nukleárního markeru (Arginine Kinase), neprojevila se zde tak vysoká fylogeografická strukturovanost. Oběma markery je však podpořena vysoká diferenciace mezi Eurasií a Amerikou a příbuznost skandinávských populací s asijskými populacemi, což podporuje hypotézu rekolonizace severní Evropy z východu nikoliv z jihu. Rozdílné výsledky mitochondriálních a nukleárních markerů jsou v podobných studiích běžným fenoménem (Forister *et al.* 2004; Sielezniew *et al.* 2011). V našem případě to může být způsobeno podstatně menším datasetem pro Arginine Kinasu, nicméně i přes to se podařilo do analýzy zahrnout velkou oblast areálu *B. eunomia*, takže by se zde i tak dala očekávat vyšší strukturovanost.

Přenos mtDNA je pouze po mateřské linii. Odlišné paterny u mitochondriálních a nukleárních markerů odrážejí různou životní historii mezi odlišnými pohlavími (Forister *et al.* 2004). Rozpor mezi haplotypovými sítěmi získanými pomocí mtDNA a nDNA je často vysvětlován v souvislosti s disperzí vázanou na pohlaví (Goudet *et al.* 2002). Znamenalo by to, že samci jsou mnohem více mobilní než samice. V našem případě však můžeme tuto hypotézu vyloučit, díky předchozím ekologickým studiím bylo zjištěno, že u *B. eunomia* je za migraci na nová stanoviště zodpovědná samice nikoliv samec (Baguette & Nève 1994; Baguette *et al.* 1996, 1998; Petit *et al.* 2001).

Dalším, v našem případě pravděpodobnějším, vysvětlením je, že mtDNA dosahuje pouze čtvrtinové efektivní velikosti populace nukleárních autozomálních sekvencí. Mitochondriální linii stačí mnohem kratší doba pro lineage sorting a k náhodné eliminaci haplotypů zde může dojít také mnohem rychleji, než k vymizení alel u nukleární DNA, což se projeví větší strukturovaností populací (Sielezniew *et al.* 2011). Proto je potřeba nahlížet na výsledky získané pouze analýzami mtDNA s obezřetností (Zhang & Hewitt 2003).

5.3 Fylogeografická historie perleťovce dvanáctitečného (*Boloria selene*) a srovnání s *B. eunomia*

I v případě temperátního druhu *B. selene* mitochondriální markery (COI) potvrdily monofyletický původ druhu. Na rozdíl od *B. eunomia* však nebyl v rámci areálu rozšíření odhalen vysoký stupeň fylogeografické strukturovanosti. Byly identifikovány pouze tři geografické haploskupiny, největší variabilita byla zjištěna v rámci jednotlivých populací (77,97%). U *B. selene*, stejně jako u druhu *Lopinga achine*, byl v rámci Palearktického regionu pozorován nízký stupeň genetické diferenciace (Kodandaramaiah *et al.* 2012). Chybějící genetické rozdíly by mohly ukazovat na výrazný genový tok mezi populacemi.

U *B. selene*, stejně jako u *B. eunomia*, došlo nejprve ke štěpení mezi eurasijskými a severoamerickými populacemi, zhruba ve stejnou dobu před 3,2 miliony let. Všechny analýzy u *B. selene* potvrzují nejvyšší genetickou diferenciaci mezi Eurasií a severní Amerikou. Genetický rozdíl mezi regiony byl tak velký, že došlo k vytvoření dvou samostatných haplotypových sítí. V severní Americe však není patrná diferenciace mezi populacemi z Kanady a USA.

V rámci Palearktického regionu došlo u *B. selene* k oddělení většiny populací zhruba před 0,7 miliony let. Pro tuto oblast je typický široce rozšířený centrální haplotyp a od něj odvozené dílčí geograficky vymezené haplotypy. Tento patern odpovídá exponenciálně rostoucí populaci (Slatkin & Hudson 1991). Centrální haplotyp je v rámci areálu druhu všudypřítomný a jednotlivé populace nejsou výrazně geneticky diferenciovány. Malá diferenciace v rámci tak velké geografické oblasti naznačuje poměrně recentní a rychlou expanzi mitochondriálního genomu. Stejný fylogeografický patern můžeme najít i u dalšího palearktického druhu *Polygonia c-album* (Kodandaramaiah *et al.* 2010). Větší diverzifikaci lze pozorovat pouze u českých a dánských populací. Nukleární marker (Wingless) nám o struktuře populací *B. selene* vypovídá téměř shodnou informaci. Jediný rozdíl je v tom, že kanadské populace zde nejsou výrazně odlišeny od ostatních.

Nízká genetická variabilita mezi populacemi naznačuje, že tento druh mohl být kontinuálně rozšířen i v dobách ledových. Tento výsledek opět potvrzuje naši teorii, že glaciály nemusely být pro mnohé druhy až tak nepříznivé.

6 ZÁVĚR

Ačkoliv mají oba druhy podobné holarktické rozšíření, nesdílejí stejnou fylogeografickou historii. *Boloria eunomia* projevuje ve srovnání s *Boloria selene* mnohem větší populační strukturovanost. Je to pravděpodobně způsobeno odlišnými nároky na prostředí, živné rostliny a klima.

Pokud porovnáme mitochondriální a nukleární markery, tak v případě *B. selene* podávaly téměř shodnou informaci. Naopak v případě *B. eunomia* fylogeografická strukturovanost mtDNA vyšla mnohem vyšší než u nukleární DNA. Důvodem může být odlišná evoluční rychlost obou markerů.

Z výsledků dále vyplývá, že nejen latitudinální, ale také longitudinální genetické paternity hrály velkou roli při formování dnešního rozšíření mnoha holarktických druhů. U *B. eunomia* můžeme longitudinální disperzi doložit na příkladu (re)kolonizace severní Evropy ze střední a východní Asie. U obou zkoumaných druhů na příkladu kolonizace severní Ameriky ze Sibíře přes Beringovu úžinu. V obou případech se projevila výrazná genetická diferenciaci mezi Palearktickým a Nearktickým regionem.

A konečně, k diferenciaci mezi populacemi dle molekulárního datování došlo mnohem dříve, než v období poslední doby ledové, což nás vede k názoru, že glaciály byly pro mnohé druhy vlastně příznivou dobou a klimatické výkyvy nemusely mít na vývoj těchto druhů až tak výrazný vliv.

7 LITERATURA

ABADJIEV S. 1995. Butterflies of Bulgaria. Vol. 3 Nymphalidae: Apaturinae and Nymphalinae. S. Abadjiev Publ. Sofia.

AVISE J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts. London.

BAGUETTE M., CONVIÉ I. & NÈVE G. 1996. Male density affects female spatial behaviour in the butterfly *Proclissiana eunomia*. *Acta Oecologica*. 17: 225–232.

BAGUETTE M. & NÈVE G. 1994. Adult movements between populations in the specialist butterfly *Proclissiana eunomia* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Ecological Entomology* 19: 1–5.

BAGUETTE M., VANSTEENWEGEN C., CONVIÉ I. & NÈVE G. 1998. Sex-biased density-dependent migration in a metapopulation of the butterfly *Proclissiana eunomia*. *Acta Oecologica* 19: 17–24.

BENEŠ J., KONVIČKA M., DVOŘÁK J., FRIC Z., HAVELDA Z., PAVLÍČKO A., VRABEC V. & WEIDENHOFFER Z. 2002. Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana I, II/Butterflies of the Czech Republic: Distribution and Conservation I, II. SOM. Praha.

BENNETT K. J. 1997. Evolution and Ecology: The Pace of Life. Cambridge University Press. Cambridge.

BESOLD J. & SCHMITT T. 2015. More northern than ever thought: refugia of the Woodland Ringlet butterfly *Erebia medusa* (Nymphalidae: Satyrinae) in Northern Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53: 67–75.

BESOLD J., SCHMITT T., TAMMARU T. & CASSEL-LUNDHAGEN A. 2008. Strong genetic impoverishment from the centre of distribution in southern Europe to peripheral Baltic and isolated Scandinavian populations of the pearly heath butterfly. *Journal of Biogeography* 35: 2090–2101.

CLEMENT M., POSADA D. & CRANDALL K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657–1660.

DALEN L., NYSTROM V., VALDIOSERA C., GERMONPRE M., SABLIN M., TURNER E., ANGERBJORN A., ARSUAGA J. L. & GOTHERSTROM A. 2007. Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the arctic fox. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 6726–6729.

DE LATTIN G. 1967. Grundriss der Zoogeographie. Fischer. Stuttgart.

DENNIS R. L. H. & SCHMITT T. 2009. Faunal structures, phylogeography and historical inference. – In: SETTELE J., SHREEVE T. G., KONVIČKA M. & VAN DYCK H. (eds.). Ecology of Butterflies in Europe. Cambridge University Press. Cambridge.

- DERCOURT J., ZONENSHAIN L. P., RICOU L. E., KAZMIN V. G., LE PICHON X., KNIPPER A. L., GRANDJACQUET C., SBORTSHIKOV I. M., GEYSSANT J., LEPVRIER C., PECHERSKY D. H., BOULIN J., SIBUET J. C., SAVOSTIN L. A., SOROKHTIN O., WESTPHAL M., BAZHENOV M. L., LAUER J. P. & BIJU-DUVAL B. 1986. Geological evolution of the tethys belt from the atlantic to the pamirs since the LIAS. *Tectonophysics* 123: 241-315.
- DESCIMON H. 1976. L'acclimatation de lépidoptères: un essai d'expérimentation en biogéographie. *Alexanor* 9: 195-204.
- DEWEY J. F., PITMAN W. C., RYAN W. B. F. & BONNIN J. 1973. Plate tectonics and the evolution of the Alpine System. *Geological Society of America Bulletin* 84: 3137-3180.
- DINCA V., RUNQUIST M., NILSSON M. & VILA R. 2013. Dispersal, fragmentation, and isolation shape the phylogeography of the European lineages of *Polyommatus (Agrodiaetus) ripartii* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 109: 817-829.
- DRUMMOND A. J., SUCHARD M. A., XIE D. & RAMBAUT A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973.
- DYKE A. S. 2004. An outline of North American deglaciation with emphasis on central and northern Canada. - In: EHLERS J., GIBBARD P. L. eds. Quaternary glaciations: extent and chronology. Elsevier. Amsterdam.
- EBERT G. & RENNWALD E. 1991. Die Schmetterlinge BadenWürttenbergs. Band 1. Tagfalter I. Ulmer. Stuttgart.
- EHRlich P. R. & HANSKI I. 2004. On the Wings of Checkerspot: A Model System for Population Biology. Oxford University Press. New York.
- EIDSEN P. B., EHRICH D., BAKKESTUEN V., ALSOS I. G., GILG O., TABERLET P. & BROCHMANN C. 2013. Genetic roadmap of the Arctic: plant dispersal highways, tradic barriers and capitals of diversity. *New Phytologist* 200: 898-910.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P. & QUATTRO J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- EXCOFFIER L. & LISCHER H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- FORISTER M. L., FORDYCE J. A. & SHAPIRO A. M. 2004. Geological barriers and restricted gene flow in the holarctic skipper *Hesperia comma* (Hesperiidae). *Molecular Ecology* 13: 3489-3499.

- GALBREATH K. E., HAFNER D. J. & ZAMUDLO K. R. 2009. When cold is better: climate-driven elevation shifts yield complex patterns of diversification and demography in an alpine specialist (american pika, *Ochotona princeps*). *Evolution* 63: 2848–2863.
- GOFFART P. & WAEYENBERGH M. 1994. Exigences écologiques et gestion des populations de deux papillons des prairies humides ardennaises: le Cuivré et le Nacré de la Bistorte (*Lycaena helle*, *Proclissiana eunomia*). *Cahiers des Réserves Naturelles* 7: 21-29.
- GORBUNOV P. J. 2001. The butterflies of Russia: classification, genitalia, keys for identification (Lepidoptera: Hesperioidea and Papilionoidea). Thesis. Jekaterinburg.
- GOUDET J., PERRIN N. & WASSER P. 2002. Test for sex-biased dispersal using biparentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology* 11: 1103-1114.
- GRATTON P. 2006. Phylogeography and conservation genetics of *Parnassius mnemosyne* L., 1758 (Lepidoptera, Papilionidae). Published PhD Thesis. University of Rome 'Tor Vergata'. Rome.
- GYLLENSTEN U. 1985. Temporal allele frequency changes in density fluctuating populations of willow grouse (*Lagopus lagopus* L.). *Evolution* 39: 115-121.
- HABEL J.C., SCHMITT T., MEYER M., FINGER A., RÖDDER D., ASSMANN T., ZACHOS F. 2010. Biogeography meets conservation: the genetic structure of the endangered lycaenid butterfly *Lycaena helle* (Denis & Schiffermüller, 1775). *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 155–168.
- HANSKI I. 1999. Metapopulation Ecology. Oxford University Press. Oxford.
- HANSKI I., KUUSSAARI M. & NIEMINEN M. 1994: Metapopulation structure and migration in the butterfly *Melitaea cinxia*. *Ecology* 75: 747–762.
- HEWITT G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- HEWITT G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- HEWITT G. M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- HEWITT G. M. 2004. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1: 4.
- HIGGINS L. G. 1975. Classification of European Butterflies. Collins. London.
- HILL J. K., THOMAS C. D. & FOX R. 2002. Response of butterflies to twentieth century climate warming: implications for future ranges. *Proceedings of the Royal Society London B* 269: 2163–2171.

- HOLDHAUS K. 1954. Die Spuren der Eiszeit in der Tierwelt Europas. *Abh zool-bot Ges Wien* 18: 1–493.
- HOPE A. G., TAKEBAYASHI N., GALBREATH K. E., TALBOT S. L. & COOK J. A. 2013. Temporal, spatial and ecological dynamics of speciation among amphi-Beringian small mammals. *Journal of Biogeography* 40: 415–429.
- HOPKINS D. M., MATTHEWS JR. J. V., SCHWEGER C. E. & YOUNG S. B. 1982. Paleocology of Beringia. Academic Press. New York.
- JAKŠIĆ P., VAN SWAAY C. & ĐURIĆ M. 2007. *Boloria eunomia* (Esper, 1799): a new species for Serbia (Nymphalidae). *Nota lepidoptera* 30: 64-70.
- KODANDARAMAIAH U., KONVICKA M., TAMMARU T., WAHLBERG N. & GOTTHARD K. 2012. Phylogeography of the threatened butterfly, the woodland brown *Lopinga achine* (Nymphalidae: Satyrinae): implications for conservation. *Journal of Insect Conservation* 16: 305-313.
- KODANDARAMAIAH U., LEES D. C., MÜLLER C. J., TORRES E., KARANTH P. K. & WAHLBERG N. 2010. Phylogenetics and biogeography of a spectacular Old World radiation of butterflies: the subtribe Mycalesina (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrini). *BMC Evolutionary Biology* 10: 172.
- KODANDARAMAIAH U., WEINGARTNER E., JANZ N., DALÉN L. & NYLIN S. 2011. Population structure in relation to host-plant ecology and *Wolbachia* infestation in the comma butterfly. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 2173–2185.
- KUDRNA O., HARPKE A., LUX K., PENNERSTORFER J., SCHWEIGER O., SETTELE J. & WIEMERS M. 2011. Distribution atlas of butterflies in Europe. Gesellschaft für Schmetterlingenschutz. Halle.
- KUTSCHERA V. E., LECOMTE N., JANKE A., SELVA N., SOKOLOV A. A., HAUN T., STEYER K., NOWAK C. & HAILER F. 2013. A range-wide synthesis and timeline for phylogeographic events in the red fox (*Vulpes vulpes*). *BMC Evolutionary Biology* 13: 114.
- KRZYWICKI M. 1967. Fauna Papilionoidea i Hesperioidea (Lepidoptera) Puszczy Białowieskiej. *Annales Zoologici* 25: 1-213.
- LANG S. 2012. The Nymphalidae of China (Lepidoptera, Rhopalocera). 1st ed. Tshikolovets. Pardubice.
- LAYBERRY R. A., HALL P. W. & LAFONTAINE J. 1998. The Butterflies of Canada. 1st ed. University of Toronto Press. Toronto.
- LIBRADO P. & ROZAS J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

- LOTTS, KELLY & NABERHAUS T. 2015. Butterflies and Moths of North America. <http://www.butterfliesandmoths.org/> (Version 04142015).
- LUNDQVIST J. & MEJDAHL V. 1995. Luminescence dating of the deglaciation in northern Sweden. *Quaternary international: the journal of the International Union for Quaternary Research* 28: 193-197.
- MAAS D. 1995. Comparaison du cycle de développement du Nacré de la Bistorte, *Procllossiana eunomia* (Lepidoptera, Nymphalidae) dans deux situations écologiques distinctes. Mémoire de Licence. Université catholique de Louvain. Louvain.
- MALICKY H. 2000. Arealodynamik und Biomgrundtypen am Beispiel der Köcherfliegen (Trichoptera). *Entomologica Basiliensia* 22: 235-259.
- MANI M. S. 1968. Ecology and Biogeography of High Altitude Insects. Springer Science & Business Media.
- MANTEL N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- MARDULYN P., MIKHAILOV Y. & PASTEELS J. M. 2009. Testing phylogeographic hypotheses in a Euro-Siberian cold-adapted leaf beetle with coalescent simulations. *Evolution* 63: 2717-2729.
- MARR K. L., ALLEN G. A., HEBDA R. J. & MCCORMICK L. J. 2013. Phylogeographical patterns in the widespread arctic-alpine plant *Bistorta vivipara* (Polygonaceae) with emphasis on western North America. *Journal of Biogeography* 40: 847–856.
- MARTTILA O., HAAHTELA T., AARNIO H. & OJALAINEN P. 1990. Suomen Piiiviiperhoset. Kirjayhtymä Oy. Helsinki.
- MAYR E. & ASHLOCK P. D. 1991. Principles of Systematic Zoology. 2nd edition. McGraw Hill. Singapore.
- MICHAUX J. R., MAGNANOU E., PARADIS E., NIEBERDING C. & LIBOIS R. 2003. Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Molecular Ecology* 12: 685-697.
- MIKKO S. & ANDERSSON L. 1995. Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4259-4263.
- MIKKOLA K. 1988. The subarctic and boreal components of the noctuid communities of the southern Siberian mountains, as indicators of postglacial movements of Noctuid faunas (Lepidoptera, Noctuidae). -In: ZLOBIN V. V. (ed.). The Connections between Entomofauna of the North Europe and Siberia. USSR Academy of Sciences. Zoological Institute. Leningrad.

- MIKKOLA K., LAFONTAINE J. D. & KONONENKO V. S. 1991. Zoogeography of the holarctic species of the Noctuidae (Lepidoptera): importance of the Beringian refuge. *Entomologica Fennica* 2: 157-173.
- MUSTER C. & BERENDONK T. U. 2006. Divergence and diversity: lessons from an arctic-alpine distribution (*Pardosa saltuaria* group, Lycosidae). *Molecular Ecology* 15: 2921–2933.
- MUTANEN M., HAUSMANN A., HEBERT P. D. N., LANDRY J. F., DE WAARD J. R. & HUEMER P. 2012. Allopatry as a Gordian Knot for Taxonomists: Patterns of DNA Barcode Divergence in Arctic-Alpine Lepidoptera. *PLoS ONE* 7(10): 47214.
- NABOKOV V. 1945 Notes on Neotropical Plebejinae (Lycaenidae, Lepidoptera). *Psyche* 52: 1–61.
- NÈVE G. 1996. Dispersion chez une espèce à habitat fragmenté: *Proclissiana eunomia* (Lepidoptera, Nymphalidae). PhD thesis. Université catholique de Louvain. Louvain-la-Neuve.
- NÈVE G., BARASCUD B., DESCIMON H. & BAGUETTE M. 2008. Gene flow rise with habitat fragmentation in the bog fritillary butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae). *BMC evolutionary biology* 8: 84.
- NÈVE G., PAVLÍČKO A. & KONVIČKA M. 2009. Loss of genetic diversity through spontaneous colonization in the bog fritillary butterfly, *Proclissiana eunomia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in the Czech Republic. *European Journal of Entomology* 106: 11–19.
- NYLANDER J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- PAMILO P. & SAVOLAINEN O. 1999. Postglacial colonization, drift, local selection and conservation value of populations: a northern perspective. *Hereditas* 130: 229-238.
- PARMESAN C., RYRHOLM N., STEFANESCU C., HILL J. K., THOMAS C. D., DESCIMON H., HUNTLEY B., KAILA L., KULLBERG J., TAMMARU T., TENNENT W. J., THOMAS J. A. & WARREN M. 1999. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399: 579–583.
- PAVLÍČKO A. 1996a. Rozšíření perleťovce mokřadního (*Proclissiana eunomia*) na Šumavě a jeho vztah k hospodaření v krajině. [The distribution of *Proclissiana eunomia* in the Šumava Mts in relation to landscape management.] *Silva Gabreta* 1: 197–202.
- PAVLÍČKO A. 1996b. Výskyt perleťovce mokřadního (*Proclissiana eunomia* Esp.) a perleťovce severního (*Boloria aquilonaris* St.) na Šumavě. [On the distribution of *Proclissiana eunomia* and *Boloria aquilonaris* in the Šumava Mts.] *Zlatá Stezka. Sborník Prachatického Muzea* 3: 311–323.

- PELHAM J. P. 2008. A catalogue of the butterflies of the United States and Canada, with a complete bibliography of the descriptive and systematic literature. *The Journal of Research on the Lepidoptera* 40: 1–652.
- PETERSEN B. 1956. Some trends of speciation in the cold-adapted holarctic fauna. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala* 30 : 233-314.
- PETIT S., MOILANEN A., HANSKI I. & BAGUETTE M. 2001. Metapopulation dynamics of the bog fritillary butterfly: movements between habitat patches. *Oikos* 92: 491–500.
- RAMSTEIN G., FLUTEAU F., BESSE J. & JOUSSAUME S. 1997. Effect of orogeny, plate motion and land-sea distribution on Eurasian climate change over the past 30 million years. *Nature* 386: 788-795.
- RONIKIER M., SCHNEEWEISS G. M. & SCHONSWETTER P. 2012. The extreme disjunction between Beringia and Europe in *Ranunculus glacialis* s. l. (Ranunculaceae) does not coincide with the deepest genetic split – a story of the importance of temperate mountain ranges in arctic-alpine phylogeography. *Molecular Ecology* 21: 5561–5578.
- RUDDIMAN W. F. & KUTZBACH J. E. 1989. Forcing of late Cenozoic northern hemisphere climate by plateau uplift in southern Asia and The American west. *Journal of Geophysical Research* 94: 18409-18427.
- SANMARTIN I., ENGHOFF H. & RONQUIST F. 2001. Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. *Biological Journal of the Linnean Society* 73.4: 345-390.
- SEDDON J. M., SANTUCCI F., REEVE N. J. & HEWITT G. M. 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10: 2187–2198.
- SETTELE J., REINHARDT R., FELDMANN R. & HERRMANN G. 2009. Ulmer Naturführer Schmetterlinge: Die Tagfalter Deutschlands. Broschiert.
- SCHMITT T. 2007. Molecular biogeography of Europe: pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 11.
- SCHMITT T. & SEITZ A. 2002. Postglacial distribution area expansion of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae) from its Ponto-Mediterranean glacial refugium. *Heredity* 89: 20-26.
- SCHMITT T., GIESSL A. & SEITZ A. 2002. Postglacial colonization of western Central Europe by *Polyommatus coridon* (Poda, 1761) (Lepidoptera: Lycaenidae): evidence from population genetics. *Heredity* 88: 26-34.
- SCHMITT T., MUSTER C. & SCHÖNSWETTER P. 2010. Are disjunct alpine and arctic-alpine animal and plant species in the western Palearctic really “relics of a cold past”? -In:

HABEL J. C. & ASSMANN T. (eds.). *Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology*. Springer-Verlag Berlin.

SCHTICKZELLE N., LE BOULENGÉ E. & BAGUETTE M. 2002. Metapopulation dynamics of the bog fritillary butterfly: demographic processes in a patchy population. *Oikos* 97: 349–360.

SIELEZNIEW M., PONIKWICKA-TYSZKO D., RATKIEWICZ M., DZIEKANSKA I., KOSTRO-AMNROZIAK A. & RUTKOWSKI R. 2011. Divergent patterns in the mitochondrial and nuclear diversity of the specialized butterfly *Plebejus argus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *European Journal of Entomology* 108: 537-545.

SIMONSEN T. J. 2005. *Boloria* phylogeny (Lepidoptera: Nymphalidae): tentatively reconstructed on the basis of male and female genitalic morphology. *Systematic Entomology* 30: 653–665.

SIMONSEN T. J., WAHLBERG N., WARREN A. D. & SPERLING F. A. H. 2010. The evolutionary history of *Boloria* (Lepidoptera: Nymphalidae): phylogeny, zoogeography and larval foodplant relationships. *Systematics and Biodiversity* 8: 513 - 529.

SLATKIN M. & HUDSON R. R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.

STEWART J. R., LISTER A. M. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of modern biota. *Trends Ecology and Evolution* 16: 608-613.

STEWART J. R., LISTER A. M., BARNES I. & DALÉN L. 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of Royal Society B* 277: 661-671.

SVENDSEN J. I., ALEXANDERSON H., ASTAKHOV V. I., DEMIDOV I., DOWDESWELL J. A., FUNDER S., GATAULLIN V. ET AL. 2004. Late quaternary ice sheet history of Eurasia. *Quatern Science Reviews* 23: 1229–1271.

SVENNING J. C., NORMAND S., KAGEYAMA M. 2008. Glacial refugia of temperate trees in Europe: insights from species distribution modelling. *Journal of Ecology* 96: 1117-1127.

TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A. G. & COSSON J. F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.

THEISSINGER K., BÁLINT M., HAASE P., JOHANNESSEN J., LAUBE I. & PAULS S. U. 2011. Molecular data and species distribution models reveal the Pleistocene history of the mayfly *Ameletus inopinatus* (Ephemeroptera: Siphonuridae). *Freshwater Biology* 56: 2554–2566.

- THEISSINGER K., BÁLINT M., FELDHEIM K., HAASE P., JOHANNESSEN J., LAUBE I. & PAULS S. U. 2013. Glacial survival and post-glacial recolonization of an arctic-alpine freshwater insect (*Arcynopteryx dichroa*, Plecoptera, Perlodidae) in Europe. *Journal of Biogeography* 40: 236–248.
- THOMAS C. D., CAMERON A., GREEN R. E., BAKKENES M., BEAUMONT L. J., COLLINGHAM Y. C., ERASMUS B. F. N., FERRELRA DE SLQUELRA M., GRALNGER A., HANNA L., HUGHES L., HUNTLEY B., JAARVELD VAN A. S., MIDGLEY G. F., MILES L., ORTEGA- HUERTA M. A., PETERSOND A. T., PHILIPPLIPS O. L. & WILLIAMS S. E. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145–148.
- TIFFNEY B. H. 1985. The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in tertiary and modern phytogeography of the Northern Hemisphere. *J Arnold Arbor* 66: 243–273.
- TODISCO V., GRATTON P., CESARONI D. & SBORDONI V. 2010. Phylogeography of *Parnassius apollo*: Hints on taxonomy and conservation of a vulnerable glacial butterfly invader. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 169–183.
- TODISCO V., GRATTON P., ZAKHAROV E. V., WHEAT C. V., SBORDONI V. & SPERLING F. H. 2012. Mitochondrial phylogeography of the Holarctic *Parnassius phoebus* complex supports a recent refugial model for alpine butterflies. *Journal of Biogeography* 39: 1058–1072.
- TUZOV V. K. & BOZANO G. C. 2006. Guide to the Butterflies of the Palearctic Region. Nymphalidae, Part II, Tribe Argynnini: *Boloria*, *Proclassiana*, *Clossiana*. Omnes Artes. Milano.
- UGELVIG L. V., NIELSEN P. S., BOOMSMA J. J. & NASH D. R. 2011a. Reconstructing eight decades of genetic variation in an isolated Danish population of the large blue butterfly *Maculinea arion*. *BMC Evolutionary Biology* 11: 201.
- UGELVIG L. V., VILA R., PIERCE N. E. & NASH D. R. 2011b. A phylogenetic revision of the *Glaucopsyche* section (Lepidoptera: Lycaenidae), with special focus on the *Phengaris–Maculinea* clade. *Phylogenetics and Evolution* 61: 237–243.
- VANDEWOESTIJNE S., BAGUETTE M., BRAKEFIELD P. M. & SACCHERI I. J. 2004. Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 630–646.
- VARGA Z. 1977. Das Prinzip der areal-analytischen Methode in der Zoogeographie und die Faunenelemente-Einteilung der europaaischen Tagsschmetterlinge (Lepidoptera: Diurna). *Acta Biologica Debrecina* 14: 223–285.

VARGA Z. & SCHMITT T. 2008. Types of areal and oreotundral disjunctions in the western Palearctic. *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 415–430.

VILA R., BELL CH. D., MACNIVEN R., GOLDMAN-HUERTAS B., REE R. H., MARSHALL CH. R., BÁLINT Z., JOHNSON K., BENYAMINI D. & PIERCE N. E. 2011. Phylogeny and palaeoecology of *Polyommatus* blue butterflies show Beringia was a climate-regulated gateway to the New World. *Proceedings of the Royal Entomological Society B* 278: 2737–2744.

WAEYENBERGH M. & BAGUETTE M. 1996. First Belgian record of *Cotesia vestalis* (Haliday, 1834), (Hymenoptera, Braconidae), parasite of *Proclossiana eunomia* (Esper, 1799) (Lepidoptera, Nymphalidae), new host species. *Belgian Journal of Zoology* 126: 81–83.

WAHLBERG N., BRABY M. F., BROWER A.V.Z., DE JONG R., LEE M.-M., NYLIN S., PIERCE N., SPERLING F.A., VILA R., WARREN A.D. & ZAKHAROV E. 2005. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 272: 1577–1586.

WAHLBERG N. & RUBINOFF D. 2011. Vagility across *Vanessa* (Lepidoptera: Nymphalidae): Mobility in butterfly species does not inhibit the formation and persistence of isolated sister taxa. *Systematic Entomology* 36: 362–370.

WAHLBERG N. & SACCHERI I. 2007. The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 104: 675–684.

WAHLBERG N. & WHEAT C. W. 2008. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology* 57: 231–242.

WARNECKE G. 1942. *Argynnis apherape* Hb. als Eiszeitrelikt in Europa (Lep. Rhop.). *Stettiner Entomologische Zeitung* 103: 50–59.

WARREN B. C. S. 1944. Review of the classification of the Argynnidi: with a systematic revision of the genus *Boloria* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 94: 1–87.

WARREN B. S. C., DOS PASSOS C. F. & GREY L. P. 1946. Supplementary notes on the classification of Argynninae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* 15: 71–73.

WEINGARTNER E., WAHLBERG N. & NYLIN S. 2006: Speciation in *Pararge* (Satyrinae: Nymphalidae) butterflies – North Africa is the source of ancestral populations of all *Pararge* species. *Systematics Entomology* 31: 621–632.

- WEIR B. S. 1996. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland. MA.
- WEIR B. S. & COCKERHAM C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- WEISS D. 1967. Perlet'ovec *Proclossiana eunomia* Esper, 1797 (*C. apherape* Hübner, 1799) v Československu (Lepidoptera, Nymphalidae). *Časopis Národního muzea - Odd. přírodovědné* 136: 195-201.
- WILLIAMS D., DUNKERLEY D., DEDECKKER P., KERSHAW P. & CHAPPELL M. 1998. Quaternary Environments. Arnold. London.
- WINKLER M., TRIBSCH A., SCHNEEWEISS G. M., BRODBECK S., GUGERLI F., HOLDEREGGER R., ABBOTT R. J. & SCHÖNSWETTER P. 2012. Tales of the unexpected: phylogeography of the arctic-alpine model plant *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) revisited. *Molecular Ecology* 21: 4618–4630.
- ZACHOS J. C., PAGANI M., SLOAN L., THOMAS E. & BILLUPS K. 2001. Trends, rythms, and aberrations in global chmate 65 Ma to Present. *Science* 292: 686-693.
- ZHANG D. -X. & HEWITT G. M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.
- ZIGOURIS J., SCHAEFER J. A., FORTIN C. & KYLE C. J. 2013. Phylogeography and Post-Glacial Recolonization in Wolverines (*Gulo gulo*) from across Their Circumpolar Distribution. *Plos ONE* 8: 83837.

8 PŘÍLOHY

Příloha 1 Přehled studovaného materiálu s uvedením druhu, označení vzorku, lokality, souřadnic, populace, haplotypové skupiny (COI), haplotypu (COI) a výsledku PCR reakce (COI, Wingless, Arginine Kinase)

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	AB5-6	Russia	Altai, Kosh-Agach district, Pereval to Dzhazator	49,692	87,476	1	G3	H14	x	-	-
eunomia	AB5-9	Canada	AB, between Rock Lake and William Switzer PP	53.332	-118.001	2	G1	H20	x	-	x
eunomia	AB5-12	Canada	AB, between Rock Lake and William Switzer PP	53.332	-118.001	2	G1	H20	x	-	x
eunomia	AB5-18	Belarus	Talka šoučina	53,324	28,358	3	G6	H31	x	-	x
eunomia	AB5-29	Norway	Barduftos	69.017	18.667	4	G3	H6	x	-	-
eunomia	AB5-32	Norway	Barduftos	69.017	18.667	4	G3	H6	x	-	-
eunomia	04HBL003073	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096680	-	-
eunomia	04HBL003068	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096678	-	-
eunomia	04HBL003063	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096676	-	-
eunomia	04HBL003065	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096674	-	-
eunomia	04HBL003071	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	-	-	GU096672	-	-
eunomia	04HBL003072	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096681	-	-
eunomia	04HBL003067	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096679	-	-
eunomia	04HBL003069	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096677	-	-
eunomia	04HBL003064	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096675	-	-
eunomia	04HBL003070	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096673	-	-
eunomia	04HBL003062	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	5	G1	H20	GU096671	-	-
eunomia	BC ZSM Lep 25470	Germany	Germany: Bavaria, Oberbayern, Landsberg	47,947	10,915	6	G8	H28	GU655024	-	-
eunomia	BC ZSM Lep 32171	Germany	Bad Toelz-Wolfratshausen, Zellwies	47,805	11,464	7	G8	H28	JF415681	-	-
eunomia	BC ZSM Lep 21543	Germany	Koenigsdorf, Weitfilz	47,817	11,450	8	G8	H26	JF415682	-	-
eunomia	NW151-13	Russia	S. Siberia, Altai Mts., Aktash vill.	50,309	87,608	9	G3	H10	HQ161271	-	-
eunomia	FS-b-4203	USA	Oxford Co., ME	44,135	-70,492	10	G1	H19	HQ161248	-	-
eunomia	FS-b-2456	Canada	Dempster Highway, YU	66,249	-137,109	11	G1	H20	HQ161228	-	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	FS-b-2407	Canada	Bragg Creek, AB	50,940	-114,579	12	G1	H20	HQ161226	-	-
eunomia	2005-LOWA-292	Russia	Russia, Pskovskaya oblast, Sebezh	56,133	28,667	13	G6	H31	FJ664014	-	-
eunomia	2005-LOWA-758	Russia	Russia, Sankt-Petersburg	59,867	29,517	14	G6	H31	FJ664012	-	-
eunomia	2005-LOWA-293	Russia	Russia, Pskovskaya oblast, Sebezh	56,133	28,667	13	G6	H31	FJ664013	-	-
eunomia	TS11	Canada	AB, WH. Hawel	53.537	113.492	15	G1	H20	DQ922869	-	-
eunomia	AB8-1	CZ	Bohemia Mer., Světlík	48.865	14.247	16	G7	H29	x	-	-
eunomia	AB8-16	CZ	Bohemia Mer., Světlík	48.865	14.247	16	G7	H29	x	-	x
eunomia	AB8-17	CZ	Bohemia Mer., Světlík	48.865	14.247	16	-	-	x	-	x
eunomia	AB8-19	CZ	Bohemia Mer., Světlík	48.865	14.247	16	G7	H29	x	-	x
eunomia	AB8-23	CZ	Bohemia Mer., Světlík	48.865	14.247	16	G7	H29	x	-	-
eunomia	AB8-24	CZ	Bohemia Mer., Světlík	48.865	14.247	16	G7	H29	x	-	-
eunomia	JB00205	Russia	Altai, Dzhazator env., Argut valley	49,871	87,353	17	-	-	x	-	-
eunomia	JB00207	Russia	Altai, Dzhazator env., Argut valley	49,871	87,353	17	-	-	x	-	-
eunomia	JB00208	Russia	Altai, Dzhazator env., Argut valley	49,871	87,353	17	G3	H13	x	-	-
eunomia	JB00210	Russia	Altai, Dzhazator env., S slopes N of village	49.842	87.542	18	G3	H12	x	-	-
eunomia	JB00211	Russia	Altai, Dzhazator env., S slopes N of village	49.842	87.542	18	-	-	x	-	-
eunomia	AB14-1	Russia	W. Sayans Mts., Khakassiya	52,022	89,307	19	G3	H8	x	-	-
eunomia	AB14-2	Russia	Yakutia, Ojmiakon Distr.	63,244	143,189	20	-	-	x	-	x
eunomia	AB14-4	Russia	W. Chukotka, Bilibino vill.	68,057	166,451	21	-	-	x	-	x
eunomia	AB14-5	Russia	Polar Ural Mts., Seida st.	67,041	63,099	22	-	-	x	-	-
eunomia	AB14-7	Russia	W. Chukotka, Bilibino vill.	68,057	166,451	21	G3	H15	x	-	x
eunomia	AB14-8	Russia	Polar tundra of Yakutia, Upper Olenek river	68,351	112,273	23	-	-	x	-	x
eunomia	AB14-10	Russia	W. Sayans Mts., Khakassiya	52,022	89,307	19	G3	H5	x	-	-
eunomia	AB14-11	Russia	C. Sakhalin, Tumovsk distr.	50,889	142,696	24	-	-	x	-	-
eunomia	AB14-13	Russia	Polar tundra of Yakutia, Upper Olenek river	68,351	112,273	23	-	-	x	-	-
eunomia	AB14-14	Russia	Yakutia, Ojmiakon Distr.	63,244	143,190	20	-	-	x	-	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	AB14-15	Russia	W. Chukotka, Bilibino vill.	68,057	166,451	21	G3	H15	x	-	-
eunomia	AB14-16	Russia	W. Chukotka, Bilibino vill.	68,057	166,451	21	G5	H1	x	-	-
eunomia	AB14-17	Russia	W. Chukotka, Bilibino vill.	68,057	166,451	21	-	-	x	-	-
eunomia	AB14-19	Russia	Polar tundra of Yakutia, Upper Olenek river	68,351	112,273	23	G3	H5	x	-	-
eunomia	AB14-21	Russia	W. Sayans Mts., Khakassiya	52,022	89,307	19	-	-	x	-	-
eunomia	AB14-22	Russia	Polar tundra of Yakutia, Upper Olenek river	68,351	112,273	23	G3	H8	x	-	-
eunomia	AB14-23	Russia	C. Sakhalin, Tumovsk distr.	50,889	142,695	24	G2	H16	x	-	-
eunomia	AB14-24	Russia	C. Sakhalin, Tumovsk distr.	50,889	142,695	24	G2	H17	x	-	-
eunomia	AB14-25	Canada	Alberta, Plateaux Mtn.	50,205	-114,521	25	G1	H20	x	-	x
eunomia	AB14-26	Poland	Bialowieza	52.839	23.922	26	G6	H31	x	-	-
eunomia	JM-132	Russia	South Ural, Tyulyuk village	54,610	58,773	27	-	-	x	-	x
eunomia	JM-140	Russia	Middle Ural, Kuzino settlement station	57,018	59,440	28	G6	H31	x	-	x
eunomia	JM-141	Russia	Magadan Province, Susuman town suburbs	62,783	148,166	29	-	-	x	-	-
eunomia	JM-149	Russia	Sayan Mts., Rep. of Buryatia, Tunkinsky Distr.	51,676	100,992	30	-	-	x	-	-
eunomia	ZF-LY-002053	Russia	Kamchatka, Bistrinskiy distr.	55,931	158,695	31	-	-	x	-	-
eunomia	ZF-LY-002054	Russia	Kamchatka, Bistrinskiy distr.	55,931	158,695	31	-	-	x	-	-
eunomia	ZF-LY-002070	Russia	Middle Ural, Kuzino settlement station	57.139	59.525	28	G6	H34	x	-	-
eunomia	ZF-LY-002071	Russia	Middle Ural, Kuzino settlement station	57.139	59.525	28	G6	H35	x	-	-
eunomia	JM-181	Russia	Altai, Dzhazator env., Argut valley	49.871	87,353	17	G3	H10	x	-	x
eunomia	JM-188	Russia	Altai, South-Chuya ridge, Ik-tu, Dzhazator env.	49.788	87.678	32	G3	H11	x	-	x
eunomia	JM-220	Russia	Khabarovsk reg., Verkhnebureinskiy district	49,399	129,553	33	G2	H17	x	-	-
eunomia	JM-221	Russia	Khabarovsk reg., Verkhnebureinskiy district	49,399	129,553	33	-	-	x	-	-
eunomia	JM-229	Russia	Khabarovsk reg., Verkhnebureinskiy district	49,399	129,553	33	-	-	x	-	-
eunomia	JM-230	Russia	Khabarovsk reg., Verkhnebureinskiy district	49,399	129,553	33	G2	H18	x	-	-
eunomia	1eu_2	CZ	Blazejovice	48,945	13,942	34	G7	H29	x	-	-
eunomia	2eu_5	CZ	Frantoly	48,980	14,079	35	G7	H29	x	-	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	2eu_7	CZ	Frantoly	48,980	14,079	35	G7	H29	x	-	-
eunomia	2eu_8	CZ	Frantoly	48,980	14,079	35	G7	H29	x	-	-
eunomia	2eu_10	CZ	Otice	48,800	14,088	36	G7	H29	x	-	-
eunomia	2eu_13	CZ	Hamr-Zadni Zvonkova	48,739	14,008	37	G7	H29	x	-	-
eunomia	2eu_14	CZ	Hamr-Zadni Zvonkova	48,739	14,008	37	G7	H29	x	-	-
eunomia	3eu_2	Germany	Elbsee	47,500	10,300	38	G7	H29	x	-	-
eunomia	3eu_3	Germany	Elbsee	47,500	10,300	38	G8	H27	x	-	-
eunomia	3eu_5	Germany	Königsdorf	47,490	11,290	39	G7	H29	x	-	x
eunomia	3eu_6	Germany	Königsdorf	47,490	11,290	39	G7	H30	x	-	x
eunomia	3eu_8	Germany	Königsdorf	47,490	11,290	39	-	-	-	-	x
eunomia	3eu_9	Austria	Mauterndorf	47,800	13,400	40	G7	H29	x	-	-
eunomia	3eu_10	Austria	Mauterndorf	47,800	13,400	40	G7	H29	x	-	-
eunomia	3eu_11	Austria	Mauterndorf	47,800	13,400	40	G7	H29	x	-	-
eunomia	3eu_12	Austria	Mauterndorf	47,800	13,400	40	G7	H29	x	-	-
eunomia	4eu_1	France	Porté-Puymorens	42,549	1,837	41	G5	H4	x	-	-
eunomia	4eu_2	France	Porté-Puymorens	42,549	1,837	41	G5	H4	x	-	-
eunomia	4eu_3	France	Porté-Puymorens	42,549	1,837	41	G5	H4	x	-	-
eunomia	4eu_4	France	Porté-Puymorens	42,549	1,837	41	G5	H3	x	-	-
eunomia	5eu_1	Bulgaria	Levsky top	42,720	24,782	42	-	-	x	-	x
eunomia	5eu_2	Bulgaria	Levsky top	42,720	24,782	42	G8	H23	x	-	x
eunomia	5eu_3	Bulgaria	Levsky top	42,720	24,782	42	G8	H23	x	-	x
eunomia	5eu_4	Finland	Lammi	64,060	29,112	43	G6	H31	x	-	-
eunomia	5eu_5	Bulgaria	Levsky top	42,720	24,782	42	G8	H23	x	-	-
eunomia	5eu_6	Belgium	Ardenes, Hockai	50,483	5,977	44	G4	H22	x	-	x
eunomia	5eu_7	Belgium	Ardenes, Hockai	50,483	5,977	44	G4	H22	x	-	x
eunomia	5eu_8	Finland	Lammi	64,060	29,112	43	G6	H31	x	-	x

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	5eu_9	Finland	Lammi	64,060	29,112	43	G6	H31	x	-	-
eunomia	5eu_10	Belgium	Ardennes, Hockai	50,483	5,977	44	G4	H22	x	-	x
eunomia	5eu_11	Finland	Lammi	64,060	29,112	43	G6	H31	x	-	-
eunomia	5eu_12	Belgium	Ardennes, Elsenborn	50,483	6,251	45	G4	H22	x	-	-
eunomia	5eu_13	Belgium	Ardennes, Elsenborn	50,483	6,251	45	G4	H22	x	-	-
eunomia	5eu_14	Belgium	Ardennes, Elsenborn	50,483	6,251	45	G4	H21	x	-	-
eunomia	5eu_15	Belgium	Ardennes, Elsenborn	50,483	6,251	45	G4	H21	x	-	-
eunomia	5eu_16	Spain	Asturias, Salcedillo	42,956	-4,010	46	G5	H2	x	-	x
eunomia	5eu_17	Spain	Asturias, Salcedillo	42,956	-4,010	46	G5	H2	x	-	x
eunomia	5eu_18	Spain	Asturias, Salcedillo	42,956	-4,010	46	G5	H2	x	-	x
eunomia	5eu_19	Spain	Pyrenees, Barrage de Matemale	42,559	2,098	47	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_20	Spain	Pyrenees, Barrage de Matemale	42,559	2,098	47	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_21	Spain	Pyrenees, Barrage de Matemale	42,559	2,098	47	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_22	Spain	Pyrenees, Barrage de Matemale	42,559	2,098	47	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_23	Spain	Asturias, Celada	42,950	-4,036	48	G5	H2	x	-	-
eunomia	5eu_24	Spain	Asturias, Celada	42,950	-4,036	48	G5	H2	x	-	-
eunomia	5eu_25	Spain	Asturias, Celada	42,950	-4,036	48	G5	H2	x	-	-
eunomia	5eu_26	Spain	Asturias, Celada	42,950	-4,036	48	G5	H2	x	-	-
eunomia	5eu_27	Spain	Pyrenees, Porta Haut	42,517	1,799	49	G5	H3	x	-	-
eunomia	5eu_28	Spain	Pyrenees, Porta Haut	42,517	1,799	49	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_29	Spain	Pyrenees, Porta Haut	42,517	1,799	49	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_30	Spain	Pyrenees, Porta Haut	42,517	1,799	49	G5	H4	x	-	-
eunomia	5eu_31	Norway	Engerdal	61,753	11,956	50	G2	H17	x	-	x
eunomia	5eu_32	Norway	Engerdal	61,753	11,956	50	G2	H17	x	-	x
eunomia	5eu_33	Norway	Engerdal	61,753	11,956	50	G2	H17	x	-	x
eunomia	5eu_35	France	Morvan, Ferme du Lyonnais	47,183	4,100	51	G4	H22	x	-	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	5eu_36	France	Morvan, Ferme du Lyonnais	47,183	4,100	51	-	-	x	-	x
eunomia	5eu_37	France	Morvan, Ferme du Lyonnais	47,183	4,100	51	G4	H22	x	-	-
eunomia	5eu_38	France	Morvan, Ferme du Lyonnais	47,183	4,100	51	G4	H22	x	-	-
eunomia	6eu_1	France	Nievre, Gien-sur-Cure	47,139	4,094	52	G4	H22	x	-	-
eunomia	6eu_2	France	Nievre, Gien-sur-Cure	47,139	4,094	52	-	-	x	-	-
eunomia	6eu_3	France	Nievre, Gien-sur-Cure	47,139	4,094	52	G4	H22	x	-	-
eunomia	6eu_4	France	Nievre, Gien-sur-Cure	47,139	4,094	52	G4	H22	x	-	-
eunomia	6eu_8	Sweden	S to Jukkasjärvi	67,828	20,594	53	G2	H17	x	-	-
eunomia	6eu_9	Sweden	S to Jukkasjärvi	67,828	20,594	53	G3	H7	x	-	-
eunomia	6eu_10	Sweden	Tol Abisko, Slaktatjokko	68,351	18,675	54	G3	H7	x	-	-
eunomia	6eu_11	Sweden	S. Hr. Mittådalen	62,696	12,688	55	G2	H17	x	-	-
eunomia	6eu_12	Sweden	S. Hr. Mittådalen	62,696	12,688	55	G2	H17	x	-	-
eunomia	6eu_13	Sweden	S. Hr. Mittådalen	62,696	12,688	55	G2	H17	x	-	-
eunomia	6eu_14	Sweden	S. Hr. Mittådalen	62,696	12,688	55	G2	H17	x	-	-
eunomia	EN1	Poland	Skieblewo	53.767	23.400	56	G6	H31	x	-	-
eunomia	EN5	Poland	Skieblewo	53.767	23.400	56	G6	H32	x	-	-
eunomia	EN31	Poland	Sokale	53.067	23.533	57	G8	H25	x	-	-
eunomia	EN35	Poland	Sokale	53.067	23.533	57	G8	H24	x	-	-
eunomia	EN40	Poland	Sokale	53.067	23.533	57	G8	H25	x	-	-
eunomia	EN45	Poland	Sokale	53.067	23.533	57	G8	H25	x	-	-
eunomia	EN61	Poland	Pogorzelec	52.717	23.817	58	G8	H25	x	-	-
eunomia	EN65	Poland	Pogorzelec	52.717	23.817	58	G8	H25	x	-	-
eunomia	EN91	Poland	Moskal	53.300	23.150	59	G3	H9	x	-	-
eunomia	EN95	Poland	Moskal	53.300	23.150	59	G3	H9	x	-	-
eunomia	EN100	Poland	Moskal	53.300	23.150	59	G6	H32	x	-	-
eunomia	EN105	Poland	Moskal	53.300	23.150	59	G6	H31	x	-	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
eunomia	EN123	Poland	Imielty Ług	50.667	22.250	60	G6	H31	x	-	-
eunomia	EN124	Poland	Imielty Ług	50.667	22.250	60	G6	H31	x	-	-
eunomia	EN153	Poland	Papiernia	50.200	23.367	61	G6	H33	x	-	-
eunomia	EN154	Poland	Papiernia	50.200	23.367	61	G6	H33	x	-	-
eunomia	EN190	Poland	Czemernik	51.333	23.283	62	G6	H33	x	-	-
eunomia	EN195	Poland	Czemernik	51.333	23.283	62	G6	H33	x	-	-
eunomia	EN213	Poland	Gązwa	53.883	21.233	63	G6	H31	x	-	-
eunomia	EN214	Poland	Gązwa	53.883	21.233	63	G6	H31	x	-	-
selene	AB5-10	Russia	Altai, Kosh-Agach district, Dzhazator Argut	49,871	87,353	1	G3	H1	x	x	-
selene	AB5-11	Canada	Elk island	53,551	112,867	2	G1	H26	x	x	-
selene	04HBL003066	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	3	G1	H26	GU096684	-	-
selene	04HBL003489	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	3	-	-	GU096682	-	-
selene	04HBL003488	Canada	Manitoba, Churchill Northern Studies Centre	58,730	-93,820	3	-	-	GU096683	-	-
selene	BC ZSM Lep 32163	Germany	Munich, Garching-Hochbrueck	48,235	11,615	4	G3	H8	JF415686	-	-
selene	BC ZSM Lep 21544	Germany	Koenigsdorf, Weitfilz	47,817	11,450	5	G3	H1	JF415687	-	-
selene	BC ZSM Lep 32164	Germany	Bad Toelz-Wolfratshausen, Babenstuben	47,830	11,480	6	G3	H1	JF415685	-	-
selene	BC ZSM Lep 30706	Germany	Niederbayern, Straubing-Bogen, Grandsberg	48,946	12,855	7	G3	H1	HM393213	-	-
selene	BC ZSM Lep 27121	Germany	Traunstein, Traunstein, Pechschnait	47,847	12,708	8	G3	H1	HM391821	-	-
selene	RVcoll.08-M344	Romania	Transylvania, Harghita, 1 Km E of Gheorgheni	46,740	25,660	9	G3	H6	HQ004104	-	-
selene	RV-07-D973	Romania	Muntenia, Dambovita, I.L. Caragiale	44,900	25,630	10	G3	H15	HQ004102	-	-
selene	RV-06-K635	Romania	Transylvania, Cluj, Baci forest (Cluj-Napoca)	46,800	23,500	11	G3	H9	HQ004100	-	-
selene	RV-07-C336	Romania	Moldavia, Suceava, Radauti	47,780	25,900	12	G3	H2	HQ004098	-	-
selene	RVcoll.08-M223	Romania	Muntenia, Dambovita, 2 Km E of Moreni	44,970	25,690	13	G3	H1	HQ004105	-	-
selene	RV-07-C902	Romania	Banat, Caras-Severin, Teregova	45,170	22,300	14	G3	H9	HQ004103	-	-
selene	RV-06-K642	Romania	Transylvania, Cluj, Baci forest (Cluj-Napoca)	46,800	23,500	11	G3	H2	HQ004101	-	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
selene	RV-07-C421	Romania	Muntenia, Dambovita, I.L. Caragiale	44,900	25,630	10	G3	H15	HQ004099	-	-
selene	RV-07-D313	Romania	Transylvania, Brasov, Racos	46,030	25,370	15	G3	H1	HQ004097	-	-
selene	NW76-13	Sweden	Vallentuna, Stockholmslän	59.550	18.317	16	G3	H1	AY090201	AY090134	-
selene	FS-b-4204	USA	Deer Lodge Co., MT	46,398	-112,736	17	G1	H27	HQ161249	-	-
selene	FS-b-2402	Canada	Itaska, AB	53,441	-113,525	18	G1	H26	HQ161222	HQ161167	-
selene	2005-LOWA-756	Russia	Russia, Sankt-Petersburg	59,867	29,517	19	G3	H1	FJ663335	-	-
selene	AB5-24	Sweden	Norden	66,010	19,550	37	-	-	-	x	-
selene	AB5-26	Poland	Podczerwone	49.417	19.817	38	-	-	-	x	-
selene	AB8-10	CZ	Bohemia Mer, Vyšší Brod, Mt. Hvězdná	48.605	14.349	20	G3	H1	x	x	-
selene	AB8-18	CZ	Bohemia Mer, Vyšší Brod, Mt. Hvězdná	48.605	14.349	20	G3	H1	x	x	-
selene	AB8-20	CZ	Bohemia Mer, Vyšší Brod, Mt. Hvězdná	48.605	14.349	20	G3	H1	x	-	-
selene	AB8-21	CZ	Bohemia Mer, Vyšší Brod, Mt. Hvězdná	48.605	14.349	20	G3	H1	x	x	-
selene	AB15-5	USA	Wisconsin, Wildcat Rd., Black River Falls	44,343	-90,783	21	G1	H29	x	-	-
selene	AB15-6	USA	Wisconsin, Wildcat Rd., Black River Falls	44,343	-90,783	21	G1	H28	x	-	-
selene	AB15-9	Belarus	Grodno region, Izva river valley, Ruda envir.	53,671	25,466	22	G3	H5	x	-	-
selene	AB15-12	USA	Wisconsin, Wildcat Rd., Black River Falls	44,343	-90,783	21	G1	H29	x	-	-
selene	JM-143	Russia	Middle Ural, Sverdlovsk P., Shabrovski village	56,650	60,560	23	G3	H14	x	-	-
selene	JM-146	Russia	South Ural, Chelyabinsk P., Plastovsky district	54,365	60,818	24	-	-	x	-	-
selene	JM-147	Russia	Middle Ural, Sverdlovsk P., Shabrovski village	56,650	60,560	23	G3	H12	x	-	-
selene	JM-195	CZ	N. Ves u Sokolova, PR Rašeliniště u Myslivny	50,082	12,776	25	-	-	x	x	-
selene	JM-196	CZ	N. Ves u Sokolova, u PP Dominova skalka	50,082	12,776	26	G3	H4	x	x	-
selene	JM-197	CZ	N. Ves u Sokolova, u PP Dominova skalka	50,082	12,776	26	G3	H3	x	x	-
selene	JM-198	CZ	Třídomy u Horního Slavkova	50,145	12,750	27	G3	H3	x	-	-
selene	JM-199	CZ	Hradiště u Kaplice	48,736	14,539	28	G3	H10	x	-	-
selene	JM-200	Romania	Ciurila nr. Cluj	46,644	23,544	29	G3	H9	x	x	-
selene	JM-201	Romania	Ciurila nr. Cluj	46,644	23,544	29	G3	H1	x	x	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
selene	JM-202	Denmark	Bornholm, Ekkodalen	55,108	14,900	30	G2	H18	x	-	-
selene	JM-203	Denmark	Bornholm, Almidingen	55,115	14,900	31	-	-	x	-	-
selene	JM-204	Denmark	Bornholm, Ekkodalen	55,108	14,900	30	G3	H13	x	x	-
selene	JM-205	Denmark	Bornholm, Almidingen	55,115	14,900	31	G3	H7	x	x	-
selene	JM-206	Denmark	Bornholm, Almidingen	55,115	14,900	31	-	-	x	x	-
selene	JM-207	Denmark	Bornholm, Ekkodalen	55,108	14,900	30	-	-	x	x	-
selene	JM-208	Denmark	Bornholm, Ekkodalen	55,108	14,900	30	G2	H16	x	x	-
selene	JM-213	Russia	Magadan reg., Tenkinsky dist., Gusakov pass.	60,435	150,973	32	G3	H11	x	-	-
selene	JM-232	Russia	Middle Ural Mts., Sverdlovsk Province	57,000	59,450	23	-	-	x	-	-
selene	JM-233	Russia	Middle Ural, Sverdlovsk P., Shabrovski village	56,617	60,600	23	G2	H24	x	-	-
selene	hr1bs0001	CZ	Hrčánky	48,908	17,675	33	G2	H19	x	-	-
selene	hr1bs0002	CZ	Hrčánky	48,908	17,675	33	-	-	x	x	-
selene	hr1bs0003	CZ	Hrčánky	48,908	17,675	33	G2	H17	x	x	-
selene	sibs631	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G3	H2	x	-	-
selene	sibs637	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	-	-	x	x	-
selene	sibs638	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G3	H1	x	x	-
selene	sibs639	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G3	H9	x	x	-
selene	sibs640	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G2	H20	x	-	-
selene	sibs641	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G2	H23	x	x	-
selene	sibs642	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	-	-	x	x	-
selene	sibs643	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G2	H25	x	x	-
selene	sibs644	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G2	H21	x	x	-
selene	sibs645	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G2	H22	x	-	-
selene	sibs646	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	-	-	x	x	-
selene	sibs647	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	-	-	x	x	-
selene	sibs648	CZ	Bile Karpaty, Sidonie	49,051	18,081	34	G2	H20	x	x	-

Druh	ID	Země	Lokalita	Latitude	Longitude	Pop.	Hap. skupina	Hap.	COI	WG	AK
selene	JM-253	CZ	Dolní Červená	-	-	35	-	-	x	-	-
selene	TS_6	France	Porte	42,548528	1,836578	36	G3	H11	DQ922868	-	-
caucasica	FS_b_4215	Russia	Albga Mts., Sochi distr.	-	-	-	-	-	HQ266647	-	-
chariclea	AB8-15	USA	San Isabel National Forest, Monarch Mt.	38,512	-106,339	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	AB5-8	Finland	Konhencoi	62,616	26,346	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	AB5-27	Finland	Portikostko	-	-	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	ZF-LY-001769	Russia	Altai Republic, Altai Mts., Dzhazator env., Argut valley	49.871	87.353	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	JM-134	Russia	E. Siberia, Republic of Buryatia, near Ulan-Ude city	51,814	107,575	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	JM-191	Russia	Altai Republic, South-Chuya ridge, Ik-tu, Dzhazator env.	49.788	87.678	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	JM-209	Greece	Pindos Mts.	39,901	21,118	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	JM-218	Kazakhstan	S. Altai, Narymsky Mt. rng., Novoberezovskoe v.	49,917	84,867	-	-	-	x	-	-
euphrosyne	NW156_23	France	Pradelles, Aude	44.771	3.884	-	-	-	HQ161286	-	-
euphrosyne	NW163_2	France	Languedoc	-	-	-	-	-	HQ161289	-	-
euphrosyne	JL5_11	Spain	Villanua, Aragon	42.677	-0.542	-	-	-	HQ161261	-	-
kriemhild	TJS_07_237	USA	Caribou Co., ID	-	-	-	-	-	HQ161292	-	-
thore	NW151_22	Russia	Polar Ural Mts.	-	-	-	-	-	HQ161278	-	-

Pop.	Země	Lokalita	N	S	h	π	Haplotypy																													
							H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30
43	Finland	Lammi	4	0	0	0																														4
44	Belgium	Ardennes, Hockai	3	0	0	0																														
45	Belgium	Ardennes, Elsenborn	4	1	0,66667	0,00146																														
46	Spain	Asturias, Salcedillo	3	0	0	0	3																													
47	Spain	Barrage de Matemale	4	0	0	0																														
48	Spain	Asturias, Celada	4	0	0	0	4																													
49	Spain	Porta Haut	4	0	0	0																														
50	Norway	Engerdal	3	0	0	0																														
51	France	Morvan	3	0	0	0																														
52	France	Nievre, Gien-sur-Cure	3	0	0	0																														
53	Sweden	S to Jukkasjärvi	2	5	1	0,01094																														
54	Sweden	Tol Abisko, Slaktatjokko	1	-	-	-																														
55	Sweden	S. Hr. Mittådalen	4	0	0	0																														
56	Poland	Skieblewo	2	0	0	0																														
57	Poland	Sokale	4	1	0,5	0,00109																														
58	Poland	Pogorzelec	2	0	0	0																														
59	Poland	Moskal	4	3	0,66667	0,00438																														
60	Poland	Imielty Lug	2	0	0	0																														
61	Poland	Papiernia	2	0	0	0																														
62	Poland	Czemernik	2	0	0	0																														
63	Poland	Gazwa	2	0	0	0																														

Příloha 5 Genetická diverzita a haplotypy v rámci populací *B. selene* (COI) (N=počet jedinců; S=počet polymorfních míst; h=haplotypová diverzita; π = nukleotidová diverzita; čísla haplotypů odpovídají haplotypům na Obrázku 8)

Pop.	Země	Lokalita	N	S	h	π	Haplotypy																													
							H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	
1	Russia	Altai, Argut	1	-	-	-	1																													
2	Canada	Elk island	1	-	-	-																														1
3	Canada	Manitoba, Churchill	1	-	-	-																													1	
4	Germany	Garching-Hochbrueck	1	-	-	-																														1
5	Germany	Weitfilz	1	-	-	-																														1
6	Germany	Babenstuben	1	-	-	-																														1
7	Germany	Grandsberg	1	-	-	-																														1
8	Germany	Pechschnait	1	-	-	-																														1
9	Romania	Harghita	1	-	-	-																														1
10	Romania	Dambovita	2	0	0	0																														2
11	Romania	Cluj, Baci forest	2	2	1	0,00588																														1
12	Romania	Moldavia, Suceava	1	-	-	-																														1
13	Romania	Muntenia, Dambovita	1	-	-	-																														1
14	Romania	Banat, Caras-Severin	1	-	-	-																														1
15	Romania	Brasov, Racos	1	-	-	-																														1
16	Sweden	Vallentuna, Stockholmslän	1	-	-	-																														1
17	USA	MT, Deer Lodge Co.	1	-	-	-																														1
18	Canada	AB, Itaska	1	-	-	-																														1
19	Russia	Sankt-Petersburg	1	-	-	-																														1
20	CZ	Vyšší Brod, Hvězdná	4	0	0	0	4																													4
21	USA	Wisconsin, Wildcat Rd.	3	1	0,66667	0,00196																														1 2
22	Belarus	Izva river valley	1	-	-	-																														1
23	Russia	Middle Ural, Shabrovski vill.	3	13	1	0,02549																														1
26	CZ	N. Ves u Sokolova	2	1	1	0,00294																														1 1
27	CZ	Třídomí u Horního Slavkova	1	-	-	-																														1
28	CZ	Hradiště u Kaplice	1	-	-	-																														
29	Romania	Ciurila nr. Cluj	2	1	1	0,00294																														1
30	Denmark	Bornholm, Ekkodalen	3	1	0,66667	0,00196																														1

Pop.	Země	Lokalita	N	S	h	π	Haplotypy																																
							H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29				
31	Denmark	Bornholm, Almidingen Tenkinsky dist., Gusakov pass.	1	-	-	-								1																									
32	Russia		1	-	-	-																																	
33	CZ	Hrčánky	2	1	1	0,00294														1		1																	
34	CZ	Bílé Karpaty, Sidonie	9	4	0,69444	0,00359	1	1																															
36	France	Porte	1	-	-	-																																	

Příloha 6 Párové F_{ST} *B. selene* (COI); číselné označení populací odpovídá číslům v Příloze 1

	pop2	pop10	pop11	pop20	pop21	pop23	pop26	pop29	pop30	pop33	pop34
pop2	-										
pop10	1,000	-									
pop11	0,923	0,000	-								
pop20	1,000	0,000	0,000	-							
pop21	0,889	0,979	0,917	0,979	-						
pop23	0,740	0,000	NA	0,000	0,754	-					
pop26	0,966	0,667	0,000	0,667	0,952	0,065	-				
pop29	0,960	0,000	NA	0,000	0,946	NA	0,500	-			
pop30	0,975	0,000	0,000	0,000	0,959	0,000	0,545	0,000	-		
pop33	0,963	0,000	NA	0,000	0,949	NA	0,000	0,000	0,000	-	
pop34	0,954	0,083	NA	0,083	0,942	NA	0,355	NA	0,056	NA	-